

MTA DOKTORA PÁLYÁZAT  
DOKTORI ÉRTEKEZÉS

---

CELLULÁRIS MARKEREK ANALÍZISE  
HEMATOLÓGIAI KÓRKÉPEKBEN

---

DR. KAPPELMAYER JÁNOS

---

DEBRECENI EGYETEM, ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM,  
KLINIKAI BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI INTÉZET

---

2006

# TARTALOMJEGYZÉK

<i>Rövidítések jegyzék</i>	<i>3. oldal</i>
<i>Bevezetés</i>	<i>5. oldal</i>
<i>Célkitűzések</i>	<i>18. oldal</i>
<i>Anyagok és Módszerek</i>	<i>19. oldal</i>
<i>Eredmények és Megbeszélés</i>	<i>35. oldal</i>
<i>Összefoglalás</i>	<i>95. oldal</i>
<i>Köszönetnyilvánítás</i>	<i>97. oldal</i>
<i>Az értekezésben felhasznált publikációk</i>	<i>99. oldal</i>
<i>Irodalomjegyzék</i>	<i>104. oldal</i>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	antibody binding capacity
ACD	acid citrát dextróz
ALL	akut lymphoid leukémia
AML	akut myeloid leukémia
ATP	adenozin trifoszfát
BSA	bovin szérum albumin
CD	cluster of differentiation
CLPD	krónikus lymphoproliferatív betegség
CMMoL	krónikus myelomonocytás leukémia
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	dimetil szulfoxid
ECL	elektrokemilumineszcencia
FITC	fluoreszcein izo-tiocianát
FSC	forward scatter
GPI	glikozil foszfatidil inozitol
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HEPES	2-hidroxietil piperazin-etán szulfonsav
LAMP	lysosome associated membrane protein
LIBS	ligand induced binding site
MAF	multidrog rezisztencia aktivitási faktor
MCV	mean corpuscular volume
MDR	multidrog rezisztencia
MFI	mean fluorescence intensity
MPO	myeloperoxidáz

MPV	mean platelet volume
MRD	minimal residual disease
PBS	phosphate buffered saline
PCA	prokoaguláns aktivitás
PE	phycoerythrin
PerCP	peridin klorofill
PFA	paraformaldehid
Pgp	P-glikoprotein
PNH	paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuria
PRP	platelet rich plasma
PV	perifériás vér
RDW	red cell distribution width
SSC	side scatter
TBS	tris buffered saline
TdT	terminális dezoxiribonukleozil transzferáz
TTBS	tris buffered saline, tween
TRAP	thrombin receptor activating peptide
vvt	vörösvértest

## BEVEZETÉS

A hematológia az a része az orvostudománynak, ahol talán leginkább tetten érhető a laboratóriumi vizsgálatok kiemelt szerepe a betegségek diagnosztikájában. Ha az anémiák, a malignus hematológiai kórképek, a haemorrhagiás diathesisek vagy a prothrombotikus állapotok kivizsgálását tekintjük, mindegyik területen perdöntő a laboratóriumi analízis a betegség diagnózisának megállapításakor, csakúgy mint a betegek monitorozása során. A laboratóriumi tesztek alapvetően három félék lehetnek:

- 1: jelenthetik sejtes antigének analízisét
- 2: valamely plazmaösszetevő mennyiségének vagy aktivitásának mérését
- 3: genetikai eltérések kimutatását

Mind a malignus hematológiai betegségekben, mind a véralvadási rendellenességek terén nagy jelentőségű a celluláris kompartment analízise.

Értekezésemben az elmúlt 12 év során a Debreceni Egyetemen végzett kísérleteimen keresztül mutatom be a celluláris markerek analízisének fontosságát a hematológiai kórképek diagnosztikájában illetve azt, hogy milyen új ismeretekhez juthatunk döntően áramlási citometriai illetve mikroszkópos technikákat alkalmazva. Az említett eljárások mellett, a feltett kérdések megválaszolására illetve állításaink igazolására számos egyéb sejtbiológiai és fehérje biokémiai módszert is alkalmaztunk. Az itt bemutatandó eredmények egyrészt az alap kutatás számára szolgáltatnak új adatokat, másrészt - reményeim szerint - a mindennapi diagnosztikus munkában nyújtanak segítséget, illetve a betegek monitorizálása során is hasznosíthatóak lesznek majd.

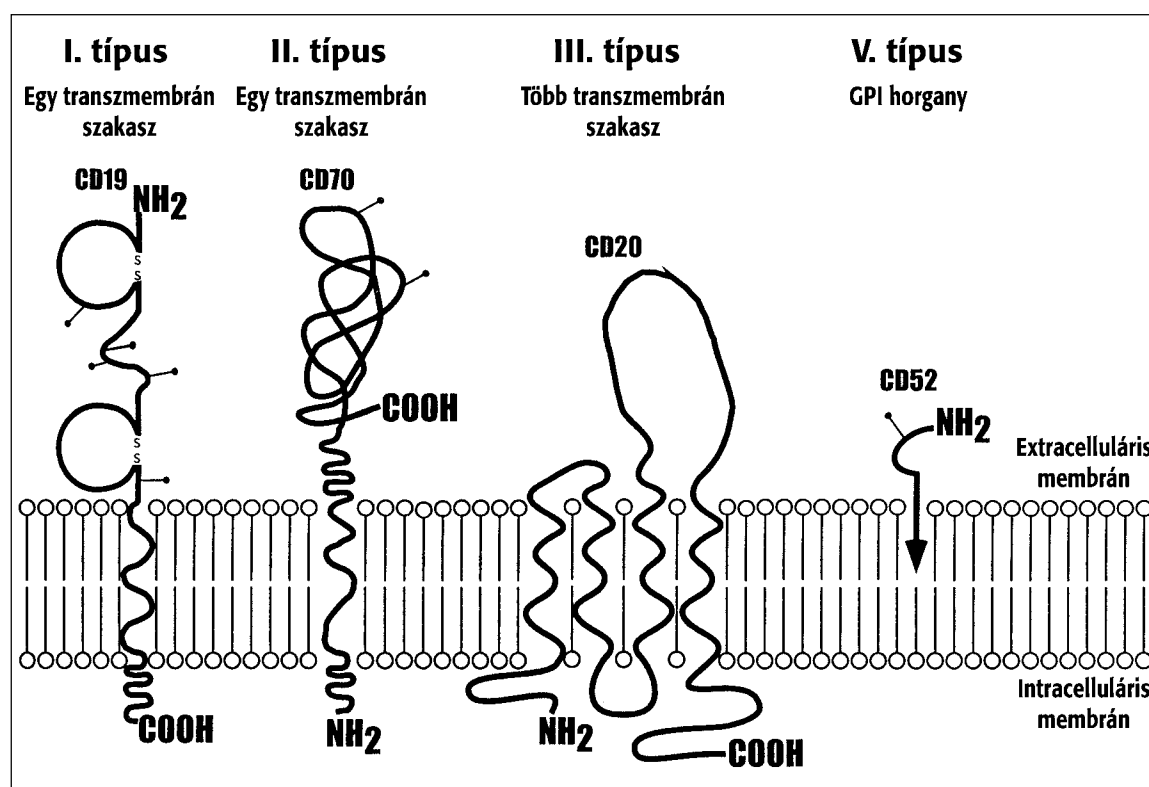
A továbbiakban rövid irodalmi áttekintést adok a celluláris markerekről és azok jelentőségéről néhány hematológiai kórképben. A Bevezetés fejezetet csak olyan mértékig részletezem, mely feltétlenül szükséges az értekezésben bemutatott eredmények megértéséhez. Ezek után ismertetem az értekezés célkitűzéseit, a felhasznált módszereket, majd az elért eredményeket és azok diszkusszióját egy közös fejezetben tárgyalom.

## Celluláris antigének

### *A membránantigének általános szerkezete és fajtái*

A membránok lipid kettős rétege és az abban elhelyezkedő és állandóan mozgásban lévő fehérjék alapján kialakított membránmodell évtizedek óta ismert (Singer and Nicolson 1971, Singer and Nicolson 1972). A sejtmembrán egy jól struktúrált, de igen dinamikus rendszer (Vereb, et al. 2003), melynek összetétele alapján azt mondhatjuk, hogy hozzávetőlegesen 50 lipidmolekulára jut egy membránfehérje. A membránfehérjék az adott membrán funkcióinak megfelelően igen nagy változatosságot mutatnak aminosav összetételüket és térszerkezetüket illetően. A gyakorlat számára is jól rendszerezhető formába a membrán antigének a CD beosztás alapján kerültek (Caligaris-Cappio 2001, Chan, et al. 1988, Chorvath and Sedlak 1998). Ekkor, az addig teljesen véletlenszerűen elnevezett membránstruktúrákat egységes számozással látták el, amely CD sorszámozás az elmúlt évtizedekben teljesen elfogadottá vált. A ma ismert több mint 330 CD markert 4 nagy csoportba sorolhatjuk (Kipps 2001). Az I-es típusú transzmembrán fehérjék azok, amelyek karboxi terminális vége az intracitoplazmatikus rész felé irányul. Ezen molekulák szignál szekvenciája lehasad miután a molekula bejut az endoplazmás retikulumba. Ezek a fehérjék általában sejtfelszíni receptor és/vagy ligand funkciót látnak el. Valamennyi I-es típusú proteinnek van egy transzmembrán szekvenciája mely általában 25 hidrofób aminosavból áll. A II-es típusú transzmembrán fehérjék fordított orientációjúak, vagyis az amino terminális rész néz az intracelluláris kompartment felé és a karboxi terminális az extracelluláris tér felé. Ezen fehérjéknek a legtöbbször hasítatlan szignál szekvenciájuk van, mely által lehasíthatók a sejt felszínéről. A III-as típusú transzmembrán fehérjék a membránt egynél több alkalommal ívelik át. Néhányan közülük akár 12-szer is áthaladnak a membránon mint pl. a multidrog rezisztencia fehérjék (Klein, et al. 1999, Pitlik E and Holló 1996). Éppen az előbb említett

tulajdonságaik alapján ezen fehérjék csatornákat képezhetnek melyek ionokat vagy kis molekulákat transzportálhatnak a kettős lipid rétegen át. Ezen csoport biológiailag igen fontos tagjai a „tetraspan” fehérjék, melyek 4 alkalommal ívelik át a membránt és mind a karboxi, mind az amino terminálisuk intracellulárisan helyezkedik el (Maecker, et al. 1997). Az egyik ilyen fehérje pl. a CD20, mely az érett B-sejtek felszínén expresszálódik és kalcium csatornaként szolgál, mely a B-sejt aktivációhoz szükséges. A IV-es típusú transzmembrán fehérjék abban térnek el a III-as típustól, hogy vízzel telt transzmembrán csatornákat tartalmaznak, azonban a CD markerek közül egyetlen egy sem tartozik ebbe a csoportba. Az V-ös típusú membrán fehérjék nem ívelik át a membránt, hanem csak az extracelluláris oldalon lipidek által horganyzódnak a citoplazmába. Ezen a csoporton belül, az egyik leggyakoribb eset az hogy GPI segítségével rögzülnek a fehérjék a plazmamembrán külső részébe (Yeh, et al. 1994). Ezt a GPI-kötést egy bakteriális eredetű foszfolipáz hasíthatja, miáltal az ily módon rögzített fehérjék leválhatnak a sejt felszínéről (1. ábra).



1. ábra: Különböző típusú CD markerek szerkezete (Kipps T.J. alapján).



Ilyen GPI horganyzott fehérje pl. a CD14, CD55 és a CD59. Ezen fehérjék GPI rögzítésének bioszintézise károsodott paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuriában. A CD markerek legnagyobb része az I-es típusú transzmembrán fehérjékhez tartozik, kevesebb a II-es és III-as típushoz, míg mindössze néhány van ami GPI horganyzott.

### ***Az intracelluláris antigének típusai***

A sejten belüli antigének in situ vizsgálata általában egyértelmű eredményt ad ha fény- vagy fluoreszcens mikroszkóppal történik, de még inkább ha konfokális laser scanning mikroszkóppal. A morfológiai vizsgálatok során lehetőség van ún. "antigen retrieval" vagyis antigén feltárás elvégzésére is, mely eljárás segítségével a mintaelőkészítés során károsodott vagy maszkírozottá vált epitópok regenerálására van lehetőség (Myers 2006) és így olyan antigének is kimutathatóak, melyek a hagyományos technikákkal negatívnak tűnnek.

Áramlási citometriai analízis esetén az intracelluláris markerek vizsgálatához a sejteket permeabilizálni szükséges. Ez leginkább valamely enyhe detergenssel való kezelést jelent, melyhez először fixálni kell a sejtszuspenziót (Jacobberger 2000). Újabban fizikai elven működő permeabilizálási eljárások pl. mikrohullámmal történő kezelés is kidolgozásra kerültek (Lan, et al. 1996, Millard, et al. 1998), de ez is formaldehidben fixált sejteken történik. Feltehetően ez utóbbi esetben alacsonyabb autofluoreszcenciát kapunk, ami a sejtpermeabilizálásnál egy jelentős probléma lehet (Millard, et al. 1998). A diagnosztikai szempontból fontos intracelluláris markerek lehetnek a sejtmagban mint pl. a TdT, a mitokondriumban pl. a bcl-2, a granulocita granulumokban pl. az MPO, a thrombocyta, alfa-granulumban a P-selectin, vagy az V-ös véralvadási faktor, vagy lehet citoplazmatikus elhelyezkedésű mint pl. a CD3 lymphoblastokban vagy a véralvadás XIII-as faktorának "A" alegysége thrombocytákban vagy monocytákban. A hemopoetikus sejtek antigénjeinek több mint 90%-a

intracellulárisan található ennek ellenére a legtöbbször pl. a leukocyták vizsgálata során kizárólag a sejtfelszíni markerek analízise történik meg, pedig az intracelluláris markerek vizsgálata malignus hematológiai betegségek kapcsán kiemelkedő fontosságú lenne.

### **Celluláris markerek vizsgálatának jelentősége hematológiai kórképekben**

Értekezésemben 4 olyan hematológiai betegségcsoporttal foglalkozom, ahol a celluláris markerek vizsgálatának kiemelt jelentősége van. Ezek az akut leukémiák, a prothrombotikus állapotok, az anémiák és bizonyos membrándefektusok. Mindegyik területen vannak természetesen egyéb típusú laboratóriumi vizsgálatok, de a celluláris markeranalízis minden esetben fontos.

#### ***Akut leukémiák***

A leukémiák fenotípusának vizsgálata, a „leukémia tipizálás” a diagnosztikai fejlődésben kulcsfontosságú volt, mivel a korábban kizárólagosan alkalmazott morfológiai és citokémiai vizsgálatok értékelése a vizsgáló gyakorlatától jelentős mértékben függ és gyakran meglehetősen szubjektív. Ezen kívül a morfológiailag vizsgálható sejtszám maximum néhány száz lehet, míg az áramlási citometriai vizsgálatok során a de novo esetek vizsgálatakor rutinszerűen 10-50 000 sejt analízise történik, de reziduális betegség keresése során akár 0,5-1 millió sejt analízisére is szükség lehet. (Dworzak, et al. 2002)

A fenotípus vizsgálatokat először indirekt, majd direkt jelölt monoklonális antitestekkel végezték egyetlen fluorofor fluoreszcencia intenzitását vizsgálva. Ezt igen hamar felváltotta a 2-színű (FITC és PE) és direkt jelölt antitestekkel történő analízis, mely sokáig "gold-standard"-ként működött. Később az újabb fluoroforok és áramlási

citométerek kifejlesztésével a 3 majd a 4 színű analízis lett elfogadott a leukémiák fenotípus vizsgálatában (Rothe and Schmitz 1996, Sanchez, et al. 2002). Jelenleg akár 7-8 szín egyidejű analízise is kivihető benchtop áramlási citométereken. Ilyen adatmennyiség feldolgozása azonban már nem lehetséges a hagyományos 2 dimenziós dot-plot megjelenítés mellett, hanem újabb szoftveres megoldásokat igényel.

A leukémiák fenotípus vizsgálatának több célja van. A diagnóziskor történő vizsgálat egyik célja a sejtvonal meghatározása. Ennek biztonságát az áramlási citometria nagyban növeli (Qadir, et al. 2006). Ezen kívül fontos a kóros koexpressziók azonosítása, illetve a sejtek érettségi fokának megítélése. Gyermekkori akut leukémiákban a kezelés során a protokollok szerinti 15. és a 33. napon, illetve a 12. héten végzett vizsgálatok pedig az MRD kimutatására irányulnak, illetve az abszolút blast szám meghatározására (Dworzak, et al. 2002). Az újabb nemzetközi protokollok általában 4 színű analízist és - a felszíni antigének mellett - néhány intracitoplazmatikus marker vizsgálatát ajánlják akut leukémiákban (Sanchez, et al. 2002). Erre részben a sejtvonal megállapítása miatt lehet szükség (pl. MPO, cyCD79a, cyCD3) vagy a sejtek érettségi állapotának jellemzésére (pl. TdT). Rendkívül fontos az aberráns fenotípusok kimutatása (Griesinger, et al. 1999, Voskova, et al. 2004), melynek MRD vizsgálat kapcsán kiemelkedő jelentősége van.

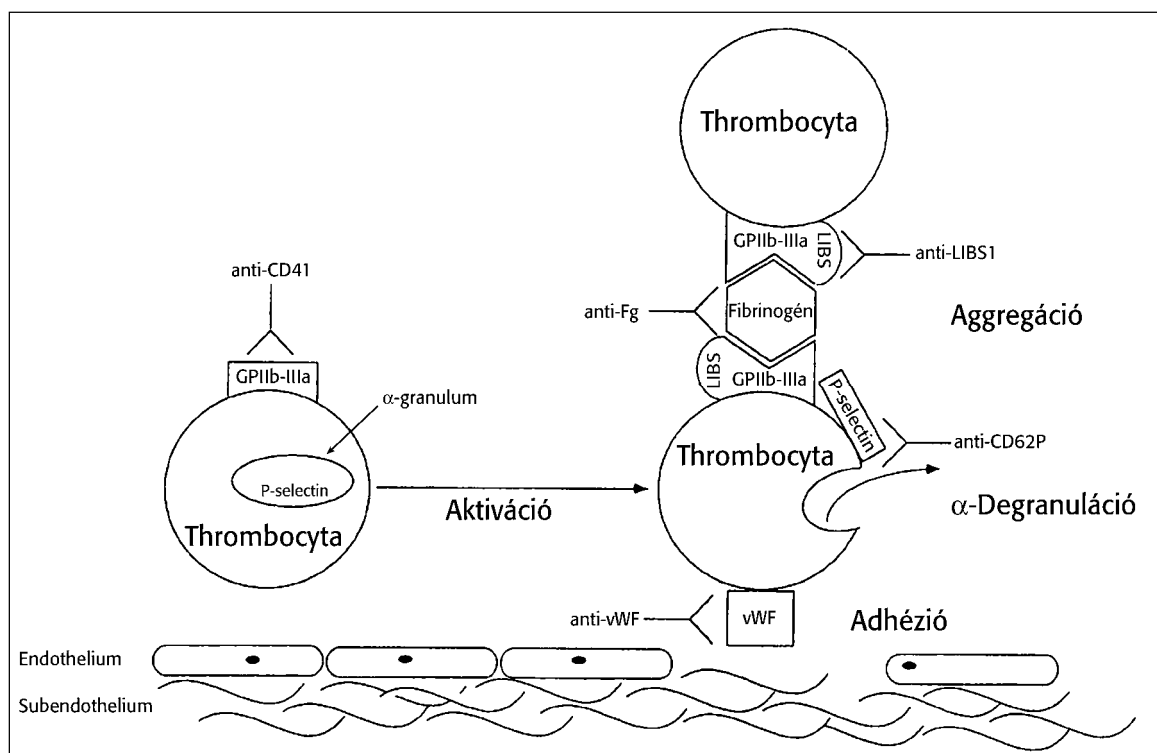
### ***A prothrombotikus állapotok***

A thrombosit megelőző állapotok kimutatása előtt először is kívánatos a fogalmak pontos tisztázása. A prothrombotikus állapotok vizsgálata nem a veleszületett thrombosis hajlam, vagyis a thrombophilia diagnosztikáját jelenti. Ez utóbbit az inhibitorok (pl. antithrombin III), az antiaktivátorok (pl. protein C és protein S) vagy a mutáns alvadási faktorok (FII, FV) vizsgálatával közelítjük meg. Fontos megemlíteni, hogy a veleszületett thrombophiliás egyéneknek szinte kizárólag vénás thrombosisuk fordul elő. Ezzel

szemben a prothrombotikus állapotokat általában a véralvadás celluláris résztvevőinek (thrombocyták, leukocyták) vizsgálatával tudjuk kimutatni és a celluláris hiperaktivitás következménye legtöbbször artériás thrombosis pl. myocardialis infarctus vagy ischaemiás stroke.

Az, hogy a leukocytáknak szerepe van a véralvadásban, egy relatíve újabb felvetésnek tekinthető, ugyanis általában a thrombosit korábban "fokozott alvadás"-ként értékelték. Mivel a leukopenia - ellentétben a thrombocytopeniával - nem jár vérzékenységgel, a leukocyták és a thrombosis közti kapcsolat nem volt nyilvánvaló. Azonban számos korábbi kísérleti eredmény alapján felvetődött, hogy a fehérvérsejtek között a monocyta/macrophag kompartment az, amely procoagulans aktivitásért felelős (Garg and Niemetz 1973, Rivers, et al. 1975). Ugyan a leukopenia valóban nem okoz vérzékenységet de kimutatták, hogy az emelkedett leukocyta szám a coronaria betegség rizikófaktorá és ezen belül is az emelkedett granulocyta és monocyta szám jelent rizikót (Lowe, et al. 1985, Prentice, et al. 1982, Schlant, et al. 1982). A sejtek vizsgálatának egyik lehetősége így a prothrombotikus állapotokban maga a sejtszám meghatározása és az abszolút sejtszámok megadása. Egy további lehetőség a sejtek térfogatának analízise. A ma alkalmazott hematológiai analizátorok meghatározzák az abszolút sejtszámokat, kivétel nélkül mérik a vörösvértestek térfogatát az MCV-t és gyakran az MPV-t is. Ezen térfogat értékeknek is igen nagy jelentősége lehet bizonyos kórképekben, hiszen pl. a nagyobb thrombocytákat hemosztázis szempontjából aktívabbnak tartják mint a kicsiket (Bath and Butterworth 1996) és régi megfigyelés, hogy thrombocytopenia esetén is azok a betegek véreznek jobban akiknek a thrombocytopeniájuk mellett a thrombocytáik kis méretűek (Eldor, et al. 1982). A prothrombotikus állapotok egyik gyakran vizsgált markere a thrombocyták hiperaktivációjának kimutatása (Andre 2004, Andrews and Berndt 2004, Gurney, et al. 2002, McEver 2001). A vérlemezkék aktivációjának

kimutatására több direkt és indirekt teszt is van. A direkt tesztek közé sorolható a thrombocyta P-selectin (CD62) illetve a LAMP (CD63) kimutatása. Ezen kívül GPIIb/IIIa glikoprotein receptorok száma emelkedik a thrombocyta aktiváció során (Gawaz, et al. 1996) és megjelenik egy olyan epitóp (PAC-1) mely csak aktivált GPIIb/IIIa receptoron mutatható ki (Shattil, et al. 1985). Ha a GPIIb/IIIa fibrinogént köt akkor úgynevezett ligand indukálta kötőhelyek (LIBS) jelennek meg a receptoron. A GPIIb/IIIa/V komplex mennyisége viszont – ellentétben a GPIIb/IIIa-val – jelentősen csökken a thrombocyta aktiváció során. A thrombocyta aktiváció során a sejtfelszínre kerülő anyagok egy része a (pl. P-selectin) a plazmába is szekretálódik (2. ábra).



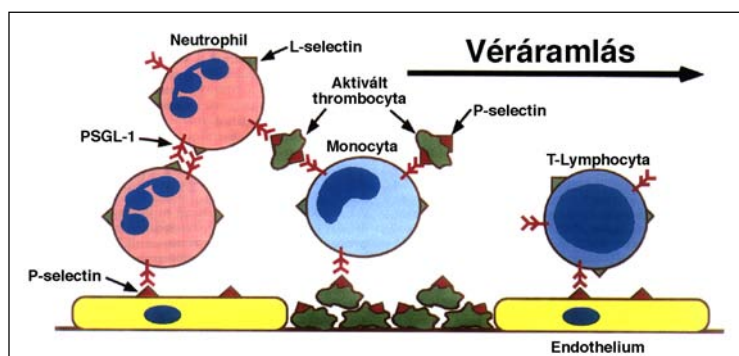
2. ábra: A thrombocyta aktiváció során bekövetkező legfontosabb folyamatok (Gawaz M. és munkatársai alapján).

A membrán összetételének egy igen érdekes változása a jellegzetes membrán asszimetria elvesztése, amelynek következtében a korábban csak az intracelluláris oldalon kimutatható foszfatidil-szerin megjelenik a membrán külső oldalán, mely specifikusan kimutatható az annexin kötés révén (Vermes, et al. 1995). Ezáltal a sejtek prokoaguláns

aktivitást nyernek. Az aktiváció során megjelenhetnek thrombocyta fragmentumok (mikropartikulák), melyek nem csak markerként hasznosíthatók, hanem jelentős prokoaguláns hatással is rendelkeznek

A mikropartikulák szinte kizárólag olyan fragmentek amelyek felszínén az annexin kötődése kimutatható (Diamant, et al. 2004, Jy, et al. 2004). Az indirekt thrombocyta aktivációs markerek közé azok az elváltozások tartoznak, melyek másodlagosan alakulnak ki a vérlemezke aktivációt követően, de amelyek szenzitivitása elérheti vagy akár meg is haladhatja az elsődleges thrombocyta aktivációs markerekét. Ide tartozik a monocyta szöveti faktor expresszió vizsgálata (Amirkhosravi, et al. 1996, Schmitz, et al. 1998), amely az esetek nagy részében áramlási citometriával történik de vizsgálható alvadási tesztben is vagy a szöveti faktor mRNS kimutatásával. Egy igen érzékeny thrombocyta aktivációs marker a thrombocyta-monocyta heterotipikus aggregátumok kimutatása mely mindig áramlási citometriával történik (Michelson, et al. 2001).

A thrombocyták és leukocyták között kialakuló úgynevezett heterotipikus aggregátumoknak jelentősége van a thrombosis pathogenesisében és ez több közvetlen receptor interakción keresztül valósul meg. Ezek között az egyik fontos receptorpár a selectinek és a selectinek fő ligandja a P-selectin glikoprotein ligand 1 (PSGL-1), (Cerletti, et al. 1999, McEver 2001, McEver 2002, McEver 2004). (3. ábra).



3. ábra: A keringő vörsejtek és az endothelium között kialakuló interakciókban a selectineknek és a PSGL-1-nek döntő szerepe van.

A selectinek és ligandjuknak abban van kiemelt szerepe, hogy a keringő leukocyták az endothel felszínén lefékeződjenek. Az aktivált endothelsejt P-selectint expresszál a felszínén, mely kapcsolódik a myeloid sejteken konstitutíven expresszáldó PSGL-1-hez. A PSGL-1 egyéb selectinekhez is (pl. a myeloid sejteken is meglévő L-selectinhez) kapcsolódhat és így egy endothelből, leukocytákból és thrombocytákból kialakuló hálózat jön létre, melyet jelentős mértékben a selectinek és ligandjuk stabilizál.

### ***Anémiák***

Az anémiák vizsgálata esetén a celluláris markerek analízise csak bizonyos vizsgálatokra illetve néhány speciális anémia típusra szorítkozik. A csökkent vörösvérsejt képzés miatti kialakuló anémiák közül a vashiányos anémia és a megaloblastos anémiák a leggyakoribbak. A celluláris markerek közül mindkét anémia típus esetében fontos adat az MCV. A plazma komponensek közül az előbbiben a vas, transzferrin, transzferrin szaturáció, ferritin, szolubilis transzferrin receptor, míg az utóbbiban a folsav és B12 vitamin analízise adja meg a diagnózishoz szükséges információt. A haemolyticus anémiák kialakulhatnak a vörösvérsejtek öröklött rendellenességei miatt (intracorpuseularis anémiák) vagy a vérpályában fennálló okok (extracorpuseularis anémiák) miatt. A celluláris markerek vizsgálata elsősorban olyan anémiákban indokolt, ahol pl. vörösvérsejteknek valamely enzim defektusa van jelen. Ez Magyarországon - a több mint 60 féle enzimkárosodás közül - szinte kizárólag a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz hiányát jelenti (Sréter, et al. 2006). A celluláris kompartment vizsgálata jelentős még bizonyos veleszületett vörösvérsejt membrán defektusok esetében, melyeket a következő fejezetben tárgyalok.

### ***Membrándefektusok***

A leukémiák esetén leírt áramlási citometriai metodikák segítségével több olyan hematológiai kórkép is vizsgálható, ahol az elváltozást nem valamely aberráns markerkombináció megjelenése jelenti, hanem éppen valamely - a normális hemopoesis során megjelenő - marker hiánya vagy csökkent expressziója. Ilyen pl. a GPI horganyzott fehérjék expressziójának teljes vagy részleges hiánya paroxysmalis nocturnalis hemoglobinuriában (Alfinito, et al. 1996). Ezt vagy az adott GPI-hez kötődő fehérjék vizsgálatával lehet igazolni, vagy egy a GPI horganyhoz kötődő anyag - mint pl. a fluoreszcensen jelölt inaktív toxin aerolizin - kimutatásával (Krauss 2003).

A vörösvértest membrán abnormalitások közé tartozik a PNH-nál gyakrabban előforduló hereditær spherocytosis. Itt a spherikus alakú, ozmotikusan fragilis vörösvértestek igen fiatalon elpusztulnak a lépben. Az alapvető biokémiai abnormalitás bizonyos struktúra fehérjék (spektrin, ankyrin, "protein 4.2", "band3") részleges deficienciája (Jarolim, et al. 1995, Maillet, et al. 1996).

A vvt membrándefektusokhoz hasonló módon azonosíthatók a veleszületett thrombocyta membrán glikoprotein defektusok, mint pl. a Glanzmann-thrombasthenia vagy a Bernard-Soulier szindróma. Az előbbi esetén a glikoprotein IIb/IIIa komplex, míg az utóbbinál a glikoprotein Ib/IX/V komplex hiánya vagy csökkent mennyisége mutatható ki (Clemetson, et al. 1982, Nurden 2005). Ezek a kórképek igen ritkák és régebben általában csak indirekt módon voltak vizsgálhatók. A PNH klasszikus vizsgálati tesztjei a hemolízis tesztek voltak, míg a thrombocyta membrán defektusok esetén - a ma is széles körben alkalmazott - aggregációs vizsgálatok. Azonban az utóbbi évtizedekben kifejlesztett és áramlási citometriában is jól alkalmazható fluoreszcensen jelölt monoklonális antitestek felhasználása a diagnosztikában is jóval egyértelműbb eredményeket ad. Ezekkel a vizsgálatokkal ma már nem csak az mondható meg, hogy



kimutatható-e az adott receptor defektusa, hanem megadható a felszíni receptorok pontos mennyisége is, azaz a deficiencia súlyossági foka, ami a kezelés illetve a betegség prognózisa szempontjából fontos lehet.

## CÉLKITŰZÉSEK

Annak érdekében, hogy a Bevezetés-ben ismertetett kórképek celluláris marker-expressziójáról többet megtudjunk, az értekezésemben felhasznált közleményekben az alábbi vizsgálatok elvégzését tűztem ki célul:

1. Vörösvérsejt méret és életkor összefüggésének analízise anémiákban
2. Vörösvérsejt, leukocytá és thrombocytá felszíneken receptorok kvantitatív analízise normál mintákon és különböző hematológiai kórképekben
3. Diagnosztikailag felhasználható új markerek keresése akut leukémiákban
4. Prognosztikailag használható multidrog rezisztencia meghatározási módszerek komparatív analízise AML-ben és sejtvonalakon
5. Prothrombotikus állapotokban thrombocytá és leukocytá hiperaktivitás markereinek vizsgálata humán mintákon
6. A leukocytá-thrombocytá interakció vizsgálata állatkísérletben létrehozott thrombosis során.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Valamennyi az értekezés összeállításában felhasznált módszer a Debreceni Egyetemen került kivitelezésre és valamennyi eredmény és publikáció is itt született illetve innen került közlésre.

### Felhasznált anyagok

#### *Vegyszerek*

A kísérletekhez az alábbi vegyszereket használtuk fel.

Acepramin (EACA)	(Pannonpharma, Pécs, Hungary)
Adiaflo Kit	(American Diagnostica, Stamford, CT)
AEBSF	(Sigma, St.Louis, MO)
4-(2-aminoetil)-benzénneszulfonil fluorid	
anti-CD41 PE	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-CD41 PerCP	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD42a FITC	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
anti-CD62 PE	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
Anti-egér FITC	(Dako, Glostrup, Denmark)
anti-FXIIIA nyúl szérum	(CenteonPharma, ZLB Behring, Marburg, Germany)
Antigen retrieval system	(Biogenex, San Ramon, CA)
aprotinin	(Richter Gedeon Rt., Budapest, Hungary)
Apyrase	(Sigma A-6535, St.Louis, MO)
$\alpha$ -Thrombin	(Sigma T-7009, St.Louis, MO)
$\alpha$ 2-Mercaptoethanol	(Sigma, St. Louis, MO)
BCA Protein Assay Kit	(Pierce, Rockford, IL)

Biotinált antiegy IgG	(VectorLaboratories, Burlingame, CA)
BSA	(Sigma, St. Louis, MO)
Calcein-AM	(MolecularProbes, Eugene, OR,USA)
Calibrite	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
Citromsav	(Reanal, Budapest, Hungary)
D-dimer ELISA	(Boehringer, Mannheim, Germany)
D-Glükóz	(Reanal, Budapest, Hungary)
Diaminobenzidin	(Sigma, St. Louis, MO)
ECL Kit	(Amersham, Buckinghamshire, UK)
EDTA	(Spektrum-3D, Debrecen, Hungary)
EnVision+ Perox, AEC	(DAKO, Glostrup, Denmark)
F1+2 ELISA	(Behring, Marburg, Germany)
FacsLysing Solution	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
Ficoll Histopaque 1007	(Sigma, St.Louis, MO)
Formalin	(Reanal, Budapest)
Glicerol	(Sigma, St. Louis, MO)
HBSS	(Sigma, St.Louis, MO)
Heparibene (Na-heparin)	(Ratiopharm, Merckle, Germany)
HEPES	(Sigma, St. Louis, MO)
Innovin	(DadeBehring, Marburg, Germany)
KCl	(ScharlauChemie, Barcelona, Spain)
Kollagenreagens Horm	(Nycomed Pharma GmbH Unterschleissheim Germany)
MAb 350	(AmericanDiagnostica, Stamford, CT)
MgCl	(Sigma, St. Louis, MO)
MOWIOL 4-88	(Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Germany)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	(Reanal, Budapest, Hungary)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(Spektrum-3D, Debrecen, Hungary)

Na <sub>3</sub> -citrát	(Sigma, St. Louis, MO)
NaCl	(Spektrum-3D, Debrecen, Hungary)
Paraformaldehid	(Sigma, St. Louis, MO)
PGE1	(Sigma P-5515, St.Louis, MO)
Propidium jodid	(Sigma, St. Louis, MO)
QIFI Kit	(Dako, Glostrup, Denmark)
Quantibrite	(Becton Dickinson, San Jose, CA)
SBH-Ketamin inj.	(SelBruHa Kft. Budapest, Hungary)
SDS	(Bio-Rad, Hercules, CA)
SURGIPATH	(Surgipath, Micromount, Richmond IL)
TAT ELISA	(Behring, Marburg, Germany)
Texas vörös streptaividin	(Amersham, Little Chalfont, UK)
Tonogen inj.	(Richter Gedeon Rt. Budapest, Hungary)
TRAP	(thrombin receptor activating peptide Sigma St.Louis, MO)
TRIS	(Bio-Rad, Hercules, CA)
Triton-X 100	(Reanal, Budapest, Hungary)
Vectastain ABC Kit	(Vector Laboratories, Burlingame, CA)
Verapamil	(Sigma, St. Louis, MO)

### ***Humán minták, sejtvonalak:***

A vizsgálatok során az alábbi humán eredetű minták kerültek alkalmazásra: heparinnal alvadásgátolt csontvelő, citráttal antikoagulált teljes vér, teljes vérből centrifugálással nyert PRP, valamint humán epidermoid carcinoma sejtvonalak, KBV-1 (human MDR1+ sejtvonal) és KB3-1 (human MDR1- sejtvonal) valamint egy monocyta irányú sejtvonal a MonoMac6, illetve egy granulocyta irányba differenciálható myeloblast sejtvonal a PLB-985.

### ***Kísérleti állatok:***

Az állatkísérletekhez minimum 10-12 hetes hím vagy nőstény C57B6/J genotípusú egereket használtunk fel, melyek tömege 20-25 gramm közötti volt mind a vad típusú mind a PSGL-1 knockout egértörzsben. A kísérleti engedély száma: 4/2003 DE MÁB és 1/2006 DE MÁB volt.

### **Módszerek**

Az 1-5. sorszámú módszerek áramlási citometriai, a 6-8. sorszámú módszerek mikroszkópos technikák. A 9-10. módszer szintén antigének vizsgálatára alkalmas (ELISA és Western-blotting), míg a 11. módszer egy koagulométerrel mérhető funkcionális teszt. A 12. metodika a sejtek térfogat szerinti szeparálására alkalmas centrifugális elutriációs technika, míg a 13. módszer az állatkísérleti rendszer ismertetése.

#### ***1. Antigének jelölése direkt és indirekt módszerrel***

A direkt jelöléshez a teljes vér és csontvelői mintákat telítő koncentrációban alkalmazott FITC-el, PE-vel vagy PerCP-vel direkt konjugált monoklonális antitestekkel 20 percig szobahőn sötétben inkubáltuk. Ezután a vörösvérsejteket FacsLysing oldattal 10 percig lizáltuk, majd a leukocytákat lecentrifugáltuk. Ezt követően a sejteket 2x mostuk PBS-ben majd 1%-os paraformaldehidben fixáltuk. Az indirekt jelölést szeparált mononukleáris sejteken végeztük, ahol először a sejtszámot  $5 \times 10^6$ -ra állítottuk, majd a sejteket 10 µg/ml végkoncentrációjú szöveti faktor ellenes antittesttel jelöltük 60 percig. A sejteket azidos PBS-ben mostuk, majd 45 percig 50x hígítású anti-egér-FITC antitesttel inkubáltuk. Ezután a sejteket 3x mostuk azidos PBS-ben, majd fixáltuk. Valamennyi

inkubációs lépést 4°C-on végeztünk. A mintákat Becton Dickinson FacScan és FacsCalibur áramlási citéméterrel mértük le Lysis II majd később CellQuest programok segítségével és a 3-as jelölés előtt a készülékeket Calibrite gyöngyökkel (bead) kalibráltuk.

## ***2. Antigének kvantitatív meghatározása***

A kvantitatív áramlási citometriai méréseket kalibráló gyöngyök segítségével végeztük kétféle elv alapján. Az egyik fajta vizsgálatban a QIFI-kit illetve az Adiaflo-kit kalibráló bead-jeit használtuk, melyre gyárilag már mindkét esetben adott számú monoklonális antitestet vittek fel. A gyöngyöket egy második antitesttel (antiegér-FITC) inkubálva 4 különböző intenzitású csúcsot kaptunk, melyek az antitestkötő képességnek megfelelő átlagos fluoreszcencia intenzitást (MFI) adnak. Az MFI értékeket és az antitestkötő kapacitást (ABC) log-log rendszerben ábrázolva egy kalibrációs egyenest kapunk. A minták jelölése során az első monoklonális antitest mindig jelöletlen és a második antitest ugyanaz az antiegér-FITC amit a gyöngyök kalibrálásához használunk, így a minták ABC értéke vagyis az antigén expresszió mértéke a kalibrációs egyenesről leolvasható. A QIFI és Adiaflo rendszer között az eltérés a kalibráló gyöngyök méretében és a felvitt antitestek mennyiségében van, így a QIFI a leukocyták, míg az Adiaflo a thrombocyták antigén expressziójának meghatározására volt inkább alkalmas. Természetesen valamennyi méréshez ugyanazon FL-1 erősítést használtuk. A másik típusú kvantitatív analízisnél a Quantibrite típusú kalibráló gyöngyökhöz PE fluorophor-t konjugáltak 1:1 arányban így adott FL-2 erősítésnél a PE jelölt antitestek esetén - ahol szintén 1 IgG: 1PE molekula az arány – az antigén expresszió megadható.

### **3. Thrombocyta aktiváció vizsgálata**

Vacutainercsőbe 0.129 M citráttal 1:10 arányban levett antikoagulált teljes vérből 40 µl-t vettünk ki. A vérlemezkék különböző mértékű aktivációs állapotában bekövetkező FXIII-A felszíni expressziót eltérő  $\alpha$ -thrombin (0-0.1 U/ml) koncentrációval aktivált mintákon vizsgáltuk in vitro, és a stimuláció a thrombocyták felszíni jelölésével egyidejűleg történt. A nem stimulált kontroll mintákban a thrombint HEPES pufferrel helyettesítettük.

A teljes vérhez telítő koncentrációban konjugált monoklonális, FXIII-A ellenes antitestetadtunk 1 µg/ml végkoncentrációban, illetve phycoerythreinnel jelölt anti-CD41 antitestet a thrombocyták azonosítása érdekében, ami a GPIIb/IIIa receptorhoz specifikusan kötődik. A mintát módosított pH 7,4-es HEPES pufferrel (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5,5 mM glükóz, 0,35 % BSA, 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) egészítettük ki 100 µl-re. A mintákat 37°C-os vízfürdőben 15 percig inkubáltuk, majd 1 ml, 1 %-os PFA-ban lefixáltuk. Legalább 1 óras szobahőmérsékleten történő fixálást követően lecentrifugáltuk 1200 g-n, 25°C-on, 15 percig, majd 1 ml PBS-ben (pH 7,4) mostuk, ezután a mintákat 0,5 ml PBS-ben szuszpendáltuk újra az áramlási citometria méréshez.

A vérlemezkék aktiváltsági állapotának követésére - ezen vizsgálatokkal párhuzamosan - a felszíni P-selectin expresszióját is megállapítottuk külön vizsgálati csőben, amelyhez anti-CD62 illetve CD42a (GPIX ellenes) monoklonális antitestet alkalmaztunk. A kettős felszíni jelölés mellett hármas jelölést (FXIII-A-FITC-CD62-PE-CD41-PerCP) is végeztünk a fenti két aktivációs marker egyidejű vizsgálata érdekében.

A mosott thrombocytákat az alábbi módon készítettük elő.

"A" oldatból (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 % glükóz, 10 mM HEPES) 10x-es hígítást készítünk desztillált vízzel, amit 37°C-ra előmelegítettük. (Az „A” oldatot, a PGE<sub>1</sub>-t és az Apyrase-t -20°C-on



tároltuk felhasználásukig.) A PGE<sub>1</sub> (1 mg/ml, Sigma, P-5515) törzsoldatból a már hígított „A” oldattal 10x-es hígítást készítünk. Az Apyrase-t (200 U/ml-s törzsoldat, Sigma, A-6535) kioldoztattuk. A vérvételt követően Vacutainer csőbe 1,5 ml ACD-t (38 mM citromsav, 75 mM Na<sub>3</sub>-citrát, 136 mM glükóz) tettünk, amihez 6 ml teljes vért szívunk le és hozzáadtuk a PGE<sub>1</sub>-et (300 ng/ml), amelyet óvatosan összeforgattunk. A mosás megkezdése előtt Advia 120 hematológiai automatán meghatároztuk a thrombocytaszámot.

A teljes vérből centrifugálással PRP-t készítettünk 150 g-n, 15 percig, 37°C-on. A PRP felső 2/3-át leszívtuk kúpos aljú műanyag csőbe, majd lecentrifugáltuk 1200 g-n, 15 percig, 37°C-on, a felülúszót leszívtuk és a thrombocytaszámot ismét ellenőriztük. Az üledék felett maradt felülúszót harmónikaszerűen összehajtott szűrőpapírral felitattuk. A thrombocyták fokozatos reszuszpendálását a PRP fele mennyiségének megfelelő 37°C-os mosófolyadékkal végeztük, amely BSA-t (0,36 %), Apyrase-t (1 U/ml) és PGE<sub>1</sub>-t (300 ng/ml) tartalmazó „A” oldat. Centrifugálás után leszívtuk a 2. felülúszót, illetve a csapadékot reszuszpendáló oldatba (BSA (0,36 %), Apyrase (1 U/ml), „A” oldat) vettük fel. A thrombocyták aktiválása a fentebb bemutatott, a teljes vérrel végzett kísérleteknek megfelelően történtek. A megjelölt thrombocyta szuszpenziót FACS Calibur citométeren analizáltuk 10 000 sejt begyűjtésével. A FXIII-A és CD62 pozitivitás analíziséhez IgG osztályú izotípus kontroll antitestet használtunk.

#### **4. Calcein assay (funkcionális teszt)**

Valamennyi esetben a leukémia diagnózisakor történt a meghatározás a korábbi leírásnak megfelelően (Hollo, et al. 1994, Homolya, et al. 1996), kisebb módosításokkal. Röviden, mononukleáris sejteket szeparáltunk perifériás vérből és csontvelőből Ficoll grádiensen (Histopaque-1007, Sigma St. Louis MO), melyet kétszer mostunk PBS-ben és  $0.5 \times 10^6$  sejtet 5 percig HBSS-ben inkubáltunk 5 percig 50  $\mu\text{mol/L}$  verapamillal vagy HBSS-el. A sejteket ezt követően 0.25  $\mu\text{mol/L}$  calcein-AM-el (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) inkubáltuk 10 percig 37°C-on. Rövid centrifugálást követően (15 sec, 14 000 rpm) a sejteket 5  $\mu\text{g/mL}$  propidium jodidban reszuszpendáltuk a sejt viabilitás vizsgálatára. A mintákat 4°C-on tároltuk és 4 órán belül lemértük FACScan áramlási citométeren (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). Az analízis során 3 régiót definiáltunk és a sejteket az FSC-SSC plot kép alapján választottuk ki (R1). Az alacsony fluoreszcencia intenzitású sejteket a hisztogram analízisből kizártuk (R2). Az elhalt sejtek kizárása pedig a magas PI fluoreszcencia alapján történt (R3). Az analízis során csak az R1+R2+R3 kapuk kritériumait teljesítő sejteket (élő leukémiás blast sejt) vizsgáltuk meg. Az analízis során 10 000 esemény adatait gyűjtöttük be Lysis II software segítségével. A multidrog transzporterek aktivitását (MAF) egy dimenzió nélküli számban adtuk meg a verapamil nélküli (Vp-) illetve a verapamil jelenlétében (Vp+) mért átlagos fluoreszcencia intenzitások (MFI) segítségével. 
$$\text{MAF} = 100 \times (\text{MFI}_{\text{Vp-}} - \text{MFI}_{\text{Vp+}}) / \text{MFI}_{\text{Vp-}}$$
A teszt minőségi kontrolljaként humán epidermoid carcinoma sejtvonalakat használtunk, melyeket korábban vinblastin jelenlétében vagy annak hiányában tenyésztettünk. A KBV-1 sejteket (humán MDR1 + sejtvonal) 10%-os magzati bovin szérummal szupplementált DMEM-ben tenyésztettük 0.2  $\mu\text{g/mL}$  vinblastin jelenlétében 5% széndioxidot tartalmazó termosztátban. A KB3-1 sejteket (humán MDR1 - sejtvonal) vinblastin nélkül tenyésztettük.

### ***5. A calcein assay és felszíni antigénjelölés kombinációja***

A calcein assay kombinációja a fluoreszcens jelöléssel azért problematikus, mert a calcein rendkívül erősen világít az FL-1 csatornán, és az FL-2 csatornán megjelenő fluoreszcencia „spillover” miatt az itt jelet adó PE-jelölt antitesttel sem alkalmazható. De megfelelő kompenzációval PerCP-konjugált antitestekkel az FL3 csatornán (>650 nm) az MDR aktivitás és a felszíni jelölés kombinálható. A minta előkészítésének első lépésében egy Ficoll-os szeparálás történt, majd verapamillal és calcein-AM-el történő inkubáció következett hasonlóan a fent leírtakhoz, de ezek után a sejteket propidium jodid nélküli HBSS-ben reszuszpendáltuk. Ez után a sejteket lecentrifugáltuk és 50 µl HBSS-ben vettük fel, melyben 10 µg/ml végkoncentrációjú PerCP-konjugált antitestel (pl. CD45, CD3, CD19) inkubáltuk 20 percig. Kontroll minták esetén PerCP-vel jelölt izotípus kontrollt alkalmaztunk. Az inkubációs idő letelte után a sejteket HBSS-ben reszuszpendáltuk és FacScan áramlási citométeren vizsgáltuk.

### ***6. Immunperoxidáz jelölés***

A FXIII-A immunreakciót a Vectastain ABC kittel végeztük. PFA-ban fixált paraffinba ágyazott metszeteket deparaffináltunk és rehidráltunk. Az endogén peroxidáz aktivitást 1%-os hidrogén peroxiddal blokkoltuk 30 percen keresztül 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abszolút metanolban. A nonspecifikus IgG kötődést 20%-os kecskeszérummal történő inkubációval gátoltuk.

Az antigén-antitest reakciót biotinált anti-nyúl IgG és avidin-biotinált peroxidáz komplex segítségével mutattuk ki a Vectastain leírása szerint. A specifikus peroxidáz aktivitást 0.05%-os diaminobenzidinnel végeztük (Sigma St Louis, MO) 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalmú 0.1 mol Tris-sósav pufferben (pH 7.2). A háttérfestés hematoxilinnal történt. A metszeteket felszálló alkoholsorban dehidráltuk és Surgipath micromount-al fedtük.

Néhány paraffinos metszeten antigén feltárást is végeztünk, hogy megvizsgáljuk annak lehetőségét, hogy a mintaelőkészítés során nem veszítettünk e el bizonyos antigén struktúrákat. Az antigén feltáráshoz az immunhisztokémiai reakció előtt a BioGenex antigén feltárási rendszerét használtuk a gyártó utasítása szerint.

Az állatkísérletek során a formalinba tett szervrészek egy éjszakán keresztül fixálódtak. Ezután következett a paraffinos beágyazás, majd 3-5 µm vastagságú metszeteket készítettünk és deparaffinizáció után immunhisztokémiai feldolgozás történt az alábbi módon. Az első antitesttel a poliklonális (nyúl) anti-humán fibrinogénnel 45 percig inkubáltuk a metszeteket, majd a második antitesttel a biotinált anti-nyúl IgG-vel 30 percig és a diaminobenzidinnel történő előhívás 3-6 percig tartott. A kísérletek egy részében csak a fibrin detektáló monoklonális antitestet, az mAb 350-et használtuk, mely egy anti-humán fibrin antitest, de keresztreakciót ad az egér-fibrinnel is (Smyth, et al. 2001). Második antitestként biotinált anti-egér IgG-t (30 perc) alkalmaztunk és a reakciót EnVision+ rendszerrel történő 30 perces inkubációval hívtuk elő. Kiegészítő magfestésként Hemalaum-Eozint alkalmaztunk.

## ***7. Fluoreszcens mikroszkópia***

A kriosztátban készült metszeteket 10 percig acetonnal fixáltuk 4°C-on. A nem-specifikus jelölődés kivédését 5%-os normál kecske szérummal történő inkubációval végezhetjük PBS-ben 25 percen keresztül. A FXIIIa kimutatása indirekt immunfluoreszcens reakcióval történt. Az FXIIIa ellenes 200x-os hígításban használt poliklonális antiszérummal történő 2 órás inkubáció után 40x-es hígítású - kecskében termeltetett - FITC-konjugált anti nyúl IgG-t használtunk 45 perces inkubáció alatt. Az FXIIIa jelölését PE-konjugált HLA-DR reakcióval vagy monoklonális KiM7, illetve RFD7 reakciókkal kombináltuk. Ez utóbbi két esetben jelölőrendszernek biotinált

antiegér IgG-t 30 percig és Texas vörössel jelölt streptavidint 45 percig használtunk. A FITC konjugált CD42b reakció esetén a FXIIIa jelölődést biotinált antinyúl IgG és Texas vörössel jelölt Streptavidin jelöléssel hívtuk elő. Kontroll kísérletekben a monoklonális antitestek helyett egér IgG-t, a FXIIIa antitest helyett megfelelően hígított nyúlserumot használtunk. Minden antitest hígításhoz és a mosási lépésekhez PBS-t használtunk. A metszeteket PBS-glicerol 1:1 arányú keverékével fedtük le. A felvételek Opton Axioplan mikroszkópban (Oberkochen, Németország) készültek.

### **8. Konfokális mikroszkópia**

A cytospin készítményeket kiolvasztottuk és 4%-os PFA-ban fixáltuk 10 percig, majd 3x mostuk PBS-ben. A FITC-el konjugált anti-FXIII monoklonális antitesteket 15 µg/ml koncentrációban vettük fel 1 mg/ml BSA-t (Sigma, Schnelldorf, Németország) tartalmazó PBS-ben, majd 0.1% Triton X-100-at adtunk a sejtekhez 30 percen át szobahőn. Az inkubáció utolsó 5 percében propidium jodidot adtunk a a jelölő oldathoz 0.5 µg/mL végkoncentrációban. Ezután a cytospin készítményeket 3x mostuk 1 mg/ml BSA-t és 0.05% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben. Végül a mintákat újra PBS-ben mostuk és 10 µl Mowiol-al (0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 25 w/v % glicerol and 10% Mowiol 4-88, Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Németország) fedtük be.

A szuszpendált sejtek jelölése hasonló protokoll szerint történt kivéve, hogy a jelöléshez 0.05% Tritont míg a mosáshoz 0.01% Tritont alkalmaztunk. A mosásokhoz 3 ml puffert használtunk és 300 g-n 5 percig történő centrifugálást végeztünk. Az utolsó pellet-et 10 µl Mowiol-al kevertük össze és tiszta tárgylemezekre vittük fel a sejteket.

A mikroszkópos analízist Zeiss (Göttingen, Németország) LSM 510 rendszerrel végeztük és C-Apochromat 63×/1.25 NA vízimmerziós objektívet használtunk. A fluoresceint 488 nm-es Argon ion laser-rel, a propidium jodidot 543 nm HeNe laser-rel

gerjesztettük és a jeleket 505-550 nm-es sávszűrőn, illetve 560 nm-es long pass filtert használva gyűjtöttük be. A detektáláshoz 1  $\mu$ m optikai szeleteket készítettünk és 512×512 pixel-es képeket készítettünk ahol a pixel idő 6.4  $\mu$ s volt. Valamennyi felvétel olyan módon történt, mely a csatornák közötti átszennyezést kiküszöbölte.

### **9. ELISA vizsgálatok (TAT, $F_{1+2}$ fragment, D-dimer FXIII-A)**

Az  $F_{1+2}$  fragment és D-dimer ELISA esetében a reakció elve hasonló volt. Az elsődleges befogó antitesttel fedett lemezekbe mértük a megfelelően hígított plazma mintákat, majd a második (peroxidáz-konjugált) antitesttel történő inkubáció után a orto-fenilén-diamin szubsztát jelenlétében értékeltük az abszorbanciaváltozást, miután a reakciót kénsavval leállítottuk. A TAT ELISA az előzőekhez teljesen hasonló volt kivéve, hogy a TAT az ELISA cső felszínéhez rögzített thrombin elleni antitestekhez kötődik. A nem kötött alkotórészeket ezután kimosással eltávolítottuk, majd egy második reakcióban a humán ATIII elleni peroxidáz-konjugált antitesteket adtunk a szabad ATIII molekulákhoz. A feleslegben lévő enzimkonjugált antitestet ezután mosással eltávolítottuk, majd a kötött enzim aktivitását az előzőekhez hasonlóan meghatároztuk. A XIII-as faktor "A" alegységének mennyiségét korábban intézetük munkacsoportja által publikált módszer alapján végeztük (Katona, et al. 2001). Itt - ellentétben az előző három ELISA-val - nem a plazmát, hanem sejtlizátumot vizsgáltunk. Streptavidinnel fedett ELISA lemezeken együtt inkubáltunk biotinált FXIII-A ellenes befogó monoklonális antitestet, hígított sejtlizátumot valamint egy másik FXIII-A epitóp ellenes peroxidázzal jelölt monoklonális antitestet. Az 1 órás inkubációt követően a plate-eket PBS-sel mostuk majd a reakciót előhívtuk és kénsavval leállítottuk. Az abszorbanciákat minden esetben Labsystem Multiscan microplate leolvasóval olvastuk le 450 nm-en.

### **10. Western-blot (FXIII-A, fibrin)**

Az értekezésben leírt Western-blot során FXIII-A-t illetve fibrint mutatunk ki. A módszer igen hasonló volt, de az előkészítési és előhívási lépésben eltérés volt a két kísérletsorozat között.

A lymphoblastokból történő FXIII-A kimutatás esetén a vvt-eket lizáltuk BD FACS lizálóval, majd a blastokat 3x mostuk 20 mM EDTA-t tartalmazó PBS-ben (2200g, 4 percig). Az utolsó mosás után a sejteket 100 µL SDS PAGE minta pufferben vettük fel (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1% brómfenol kék, 4.5% merkaptóetanol) és a keveréket 5 percig forraltuk. A mintákból minden esetben egyforma sejtszámnak megfelelő lizátumot vittünk fel.

A mintát 7.5%-os SDS poliakrilamid gélre vittük fel, és 40 mA-en redukáló közegben elektroforetizáltuk, majd Immobilon P membránra (Millipore, Bedford, MA) blottoltuk (Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell készülék, Bio-Rad). A nem specifikus kötések blokkolására 1 órán át rázógépen szobahőn 3%-os zselatin tartalmú oldatban (0.5 M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH: 7.5; TBS) inkubáltuk a membránt, majd éjszakára 4°C-on TBS-ben tartottuk. Az első antitest FXIIIA ellenes poliklonális nyúl szérum 5000x hígítása volt 1%-os zselatinos TBS-ben. Ezt követően 1 óra inkubáció következett a rázógépen, majd mosás TTBS-ben 3x5 percig. A 2. antitest biotinált anti-nyúl immunglobulin 4000x hígítása volt. Újabb 30 perc inkubáció következett a rázógépen lefedve, majd mosás TTBS-ben 3x5 percig és ezután Vectastain-kittel történt az előhívás. A szubsztrát oldat ECL elve alapján detektálta a sávokat, melyeket röntgenfilmen rögzítettünk.

A fibrin kimutatását egér tüdőszövetekből extrahált fibrinen végeztük az alábbi módon. Az egér tüdőszöveteket preparálás után 1 ml extrakciós pufferbe helyeztük, melynek összetétele az alábbi volt: 150mM NaCl, 10mM EDTA, 100U/ml heparin,

10mM Tris, 0.1M  $\epsilon$ -aminokapronsav, 10U/ml aprotinin 24  $\mu$ g/ml végkonc. AEBSF4-(2-aminoethyl)-benzénszulfonilfluorid (pH=7.4). Ezután folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk kb. 1 percig és felhasználásig -20°C-on tároltuk a szöveteket. A kísérlet kezdetekor a tüdőt 37°C-os vízfürdőn kiolvasztottuk, majd 100 mg szövethez 0.5 ml extrakciós puffert adtunk és a szövetet Medimachine készüléken (DAKO, Glostrup, Dánia) homogenizáltuk. A mintákat 4 órán keresztül jégen inkubáltuk, majd eppendorf centrifugában 2x centrifugáltuk (16000g, 4°C, 30 perc) és az üledéket 200 $\mu$ l denaturálóban (1.51g Tris, 4.0g SDS és 20mL glicerol 100mL desztillált vízhez, pH=6.8) vettük fel. Ezután a mintákat 18 órán át inkubáltuk 37°C-os vízfürdőben és centrifugálás (16 000g, 25°C, 30 perc) után felülúszóból dolgoztunk tovább. A fehérjetartalom meghatározását BCA Protein Assay Kittel végeztük. Az azonos fehérjetartalmú mintákat a FXIII-A esetén leírt módon elektroforetizáltuk és blottoltuk. A fibrin detektálása esetén azonban az mAb 350 monoklonális antitestet használtuk és másodlagos antitestnek kecskében termeltetett biotinált anti-egér immunglobulint alkalmaztunk, majd a reakciót az előzőekben leírt ECL detektáló rendszerrel tettük láthatóvá.

### ***11. Egyfázisú alvadási teszt***

Az egyfázisú alvadási assayt korábbi leírás módosítása alapján végeztük (Conkling, et al. 1988, Kappelmayer, et al. 1998). Az előzőekben leírt Ficollon történő szeparálás után kapott mononukleáris sejteket PBS-ben mostuk, majd hematológiai automata segítségével (Bayer Technicon H1, Tarrytown NJ) megszámoltuk, a mintából kenetet készítettünk, amiből meghatároztuk a monocyta arányt. A mononukleáris sejtek neutrophil aránya valamennyi esetben 5% alatti volt. Ezután a sejteket Branson B-30-as szonikálóval 3x30 másodpercig lizáltuk majd 100  $\mu$ l lizátumot 100  $\mu$ l normál plazmával inkubáltunk 5



percig és az alvadási reakciót 100 µl 25 mmol/L-es CaCl<sub>2</sub> hozzáadásával indítottuk el. Az alvadási időket egy rekombináns thrombolasztin (Innovin, Dade) hígításaihoz hasonlítottuk, úgy hogy a 10x-es hígítást tekintettük 100 000 mU-nak. A mononukleáris sejtek prokoaguláns aktivitását mU/10<sup>6</sup> monocytára adtuk meg.

## ***12. Ellenáramlásos centrifugális elutriáció***

A centrifugális elutriáció a sejtek méret szerinti szeparálására szolgáló módszer, mellyel perifériás vér vagy csontvelő ritkább sejtpopulációinak (pl. monocyta vagy megakaryocyta) nagy tisztaságú előállítását lehet elérni. A módszer másik felhasználási területe, hogy homogén sejtpopulációk (pl. vörösvértest, thrombocyta) sejttérfogat szerinti elválasztását teszi lehetővé. Kísérleteinket egy korábban leírt módszer (van der Vegt, et al. 1985) kisebb módosítása alapján végeztük Beckman JE6B elutriációs rotorral. A méréseknél 0.8 ml EDTA-val alvadásgátolt teljes vért foszfátpufferrel 10x-re hígítottunk és 5 ml/perc-es pumpasebességnél az elutriációs kamrába mostuk. A sejteket a kamrából szekvenciálisan gyűjtöttük, úgy hogy a pumpasebességet 1 ml/perc-enként növeltük 20 ml/perc értékig Gilson Minipuls 2 pumpát használva. A további vizsgálatok előtt a vörösvértest üledéket 2 ml PBS-ben vettük fel (Kocsis, et al. 1998). Az MCV értékeket Bayer Technicon H1 hematológiai automatával határoztuk meg, a retikulocyta méréshez tiazol narancs festékkel jelöltük a sejtszuspenziókat és a retikulocyta arányt FacScan áramlási citométerrel határoztuk meg RetiCount szoftver segítségével. A hemoglobin komponensek – így a HbA<sub>1c</sub> – azonosítása a BioRad Diamat teljesen automatizált kromatográfiás rendszerével történt.

### ***13. Egér thrombosis modell kivitelezése***

Az állatkísérleti modellben a 12-18 hetes (20-25 grammos) C57B6/J genotípusú, PSGL-1 knockout egerek altatása intraperitonealis SBH-Ketamin injekcióval (100-120 µl/egér) történt. A hatás 3-6 perc alatt állt be és átlag 60 percig tartott. Az elaltatott egerek farokvénájába 100 µl térfogatban bejuttattunk 15 µg kollagént + 2 µg Tonogent, a kontroll állatokba pedig 100 µl fiziológiás sóoldatot. A 3. percben a retroorbitális plexusból heparinózott kapilláris segítségével vért vettünk sejtszám meghatározásra mely Bayer Advia 120 készülékkel történt, valamint TAT komplex meghatározására a plazmát lefagyasztottuk. A 30. percben cervicalis dislocatiót hajtottunk végre az egereken. Ezután felboncoltuk őket és eltávolítottuk a tüdőt, vesét, májat, lépét, szívet. A szerveket kettémetszettük és egyik felét 10 %-os formalinba, másik felét extrakciós pufferbe tettük, melynek összetétele az alábbi volt: 150mM NaCl, 10mM EDTA, 100U/ml heparin, 10mM Tris, 0.1M ε-aminokapronsav, 10U/ml aprotinin 24 µg/ml végkonc. AEBSF4-(2-aminoethyl)-benzénszulfonilfluorid (pH=7.4).

## EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Az itt összegzett kísérleti eredmények az experimentális és klinikai hematológia több területét érintik ezért a könnyebb áttekinthetőség és érthetőség miatt az eredmények ismertetése és azok megbeszélése minden tématerületen közvetlenül egymás után kerül majd bemutatásra.

### 1. Celluláris markerek anémiákban

#### 1.1 *Az MCV és a vvt életkor összefüggése*

A vörösvérsejtek átlagos élettartama 120 nap. A korábbi vizsgálatok alapján az a nézet alakult ki, hogy a fiatalabb vörösvérsejtek nagyobbak, majd a kor előrehaladtával a sejtek mérete csökken (Bosch, et al. 1992). Ezeket a megállapításokat a sejtek szeparálása alapján tették, melyet vagy a sűrűség alapján történő izolálással (Cohen, et al. 1976) vagy centrifugális elutriáció segítségével nyertek. A centrifugális elutriáció homogén sejtpopulációkat a térfogatuk alapján szeparál és a sejtek térfogata pedig - általános feltételezés szerint - azok életkorával arányos. A korábbi vizsgálatok eredményei alapján úgy tartották, hogy a vvt életkorral a HbA1c koncentráció arányos, mivel a vvt-ben az élete során a hemoglobin folyamatos non-enzimatis glikoziláción megy át. Annak kiderítésére, hogy vajon az MCV abszolút módon determinálja-e a vvt életkorát, anisocytosis minták vörösvérsejtjeiben vizsgáltunk meg HbA1c és reticulocita tartalmat.

A vizsgálatokhoz az alábbi mintákat használtuk fel: normocytos anisocytosis urémiás minták, microcytos anisocytosis vashiányos anémiás minták és macrocytos anisocytosis megaloblastos anémiás minták.

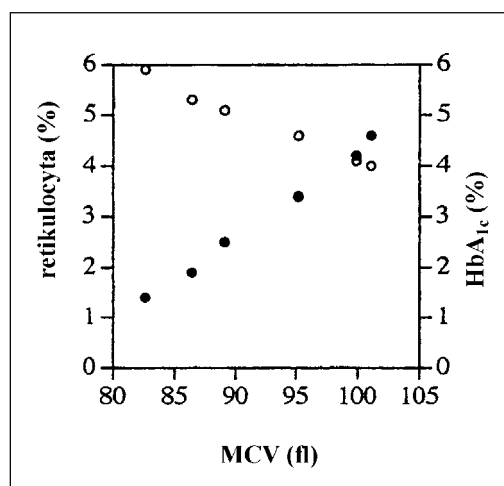
A betegek jellemzőit az 1.-es táblázat mutatja be.

<b>Microcyter minták</b>					
Diagnózis	MCV (fl)	RDW (%)	Hemoglobin (g/l)	vas (μmol/l)	ferritin(μg/l)
vashiányos anémia	63.2±0.9	19.1±1.9	118±7.1	602±1.5	4.8±0.8
<b>Normocyter minták</b>					
Diagnózis	MCV (fl)	RDW (%)	Hemoglobin (g/l)	urea (mmol/l)	kreatinin (μmol/l)
Uremia	90±2.1	20.6±1.5	90.2±2.7	20.1±602	278±66
<b>Macrocyter minták</b>					
Diagnózis	MCV (fl)	RDW (%)	Hemoglobin (g/l)	csontvelői kép	
Megaloblastos anémia	106.8±3.2	21.8±1.1	115.4±2.6	Hypercelluláris csontvelő proliferáló megaloblastokkal, intenzív mitotikus aktivitással.	

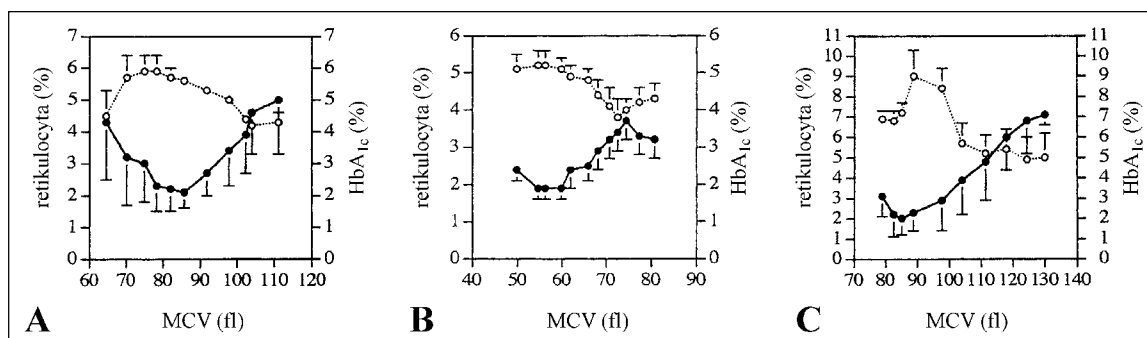
1. táblázat: A betegek laboratóriumi jellemzői (n=5, átlag ± SEM).

A betegek a vizsgálat előtt nem részesültek transzfúzióban, poikilocytosis nem volt jelen, csak anisocytosis. A centrifugális elutriáció során a vvt frakciókat az 5 és 20 ml/perc-es átfolyási sebesség között lehetett begyűjteni. A begyűjtött frakciókban az MCV értéket Bayer Technicon H1 hematológiai automatával, a reticulocita arányt tiazol narancs jelölés után FacScan áramlási citométerrel, míg a HbA<sub>1c</sub>-t automatizált HPLC-vel (BioRad Diamat) végeztük.

Az irodalomban korábban közölt vvt elutriációs közleményekben korábban 6 frakciót különítettek el, melyből azt a következtetést vonták le, hogy az MCV növekedésével nő a reticulocita arány és csökken a HbA<sub>1c</sub> aránya. Normál minták esetén mi is hasonló eredményt kaptunk (4. ábra). Azonban anisocytos minták esetén csak az elutriációs görbe középső szakasza mutatott hasonló képet (5. ábra). A görbék mindkét vége ellaposodott vagy a tendencia meg is fordult.



4. ábra: Normál RDW-vel rendelkező minta elutriációs profilja (üres kör: glikált hemoglobin, teli kör: reticulocita).



5. ábra: Normocytaer (A), microcytaer (B) és macrocytaer (C) anémiás minta HbA<sub>1c</sub> és retikulocyta tartalma. Az RDW minden esetben jelentősen emelkedett volt (n=5, átlag±SEM). Üres kör: HbA<sub>1c</sub>, fekete kör: retikulocyta

A vizsgálataink alapján elmondható, hogy a centrifugális elutriáció megfelelő technika a különböző méretű vvt-k elválasztására igen nagy mérettartományban. Ezt korábbi vizsgálatok során csak a Percoll-os szeparálás és a centrifugális elutriáció kombinációjával tudták elérni (Bosch, et al. 1992). Mivel az MCV a vvt életkorával összefügg, feltételezhetően az elutriáció különböző életkorú vvt frakciókat eredményez. Ezt korábban bizonyos szerzők megkérdőjelezték és arra a következtetésre jutottak, hogy a vvt mérete nem megfelelő markere a vvt életkorának, és hogy a centrifugális elutriáció nem alkalmas korfüggő vvt populációk előállítására (Vaysse, et al. 1988). Eredményeink alapján elmondható, hogy a centrifugális elutriáció mindig korfüggő vvt frakciókat eredményezett normál RDW-vel rendelkező normocytaer mintákban és a patológiás minták elutriációs profiljának középső szakaszán. Azonban az elutriációs görbék végén a legkisebb sejtek nem a legöregebbek és a legnagyobb sejtek nem a legfiatalabbak. Az RDW a hematológiai diagnosztikában gyakran használt paraméter, mivel anémiák esetén az RDW értéke gyakran hamarabb emelkedik, mint ahogy a hemoglobin koncentráció csökken. Eredményeink arra utalnak, hogy ilyen esetekben adott MCV-vel rendelkező vvt-k korban heterogének lehetnek. Nem kizárt, hogy anisocytosis során a vvt nem veszít folyamatosan vizet a vvt öregedésének utolsó szakaszában. A másik lehetőség, hogy a nagy és az alacsony sűrűségű vvt-k okozzák az eredményt, ugyanis ezek pusztán

centrifugális elutriációval nem választhatók szét. Érdekes, hogy olyan sejttípusoknál, ahol a sejtméret igen nagy heterogenitást mutat, mint pl. a thrombocyta vagy a granulocyta esetén a sejttérfogat nem mutat korrelációt a korrall (Berkow and Dodson 1987, d'Onofrio, et al. 1995), míg az igen homogén vvt-k esetében a sejtméret általában meghatározza a sejt életkorát, hacsak nincs jelentős méretbeli variabilitás mint anisocytosis esetén. Összefoglalva elmondható, hogy a centrifugális elutriáció megbízható módszer a vvt-k méretbeli elválasztására igen széles mérettartományban, azonban a sejtméret nem megbízható markere az életkornak patológiás körülmények között.

### ***1.2 A normál sejtek standardként való alkalmazása PNH-ban***

Az anémiák egy speciális csoportja a paroxysmalis nocturnal haemoglobinuria (PNH) a pluripotens őssejt szerzett megbetegedése, mely a PIG-A gén szomatikus mutációjának következménye. Ez a gén vesz részt a GPI horgany szintézisében, melynek jó néhány felszíni receptor rögzítésében is szerepe van. A PNH kialakulásához 2 faktor egyidejű meglétére van szükség: a mutált őssejt és hyoplasztikus csontvelő. Az áramlási citometria módszerek elterjedése előtt a PNH-t a Ham-teszt vagy a szukróz hemolízis teszt segítségével diagnosztizálták. Ezek a tesztek komplement aktivációt követően a PNH-s vvt-k hemolízissel szembeni fokozott érzékenységen alapulnak. Az utóbbi években azonban az áramlási citometria vált a PNH standard vizsgálati módszerévé (Hall and Rosse 1996, Piedras and Lopez-Karpovitch 2000, Schubert, et al. 1991). Az áramlási citometria előnye az, hogy nem-hemolizáló betegekben meglévő kis PNH klónok kimutathatók és megadható a III-as típusú (komplett deficiencia), II-es típusú (részleges deficiencia) és I-es típusú (normál) sejtek aránya. Mi, vizsgálatunkban olyan megbízható numerikus adatot kerestünk, mellyel a GPI-horganyzott fehérjék deficienciájának súlyossága jellemezhető.

2001. január és 2004. december között 80 olyan beteg mintáját vizsgáltuk PNH irányába ahol klinikailag hemolízis állt fenn, melyek között mindössze 4 esetben lehetett kimutatni PNH-t. Mind a 4 beteg anamnézisében hasi fájdalom, hányás, sötét vizelet és láz szerepelt. A laboratóriumi tesztek nem konjugált hyperbilirubinémiát, emelkedett LDH aktivitást és hemolízist mutattak. (2. táblázat).

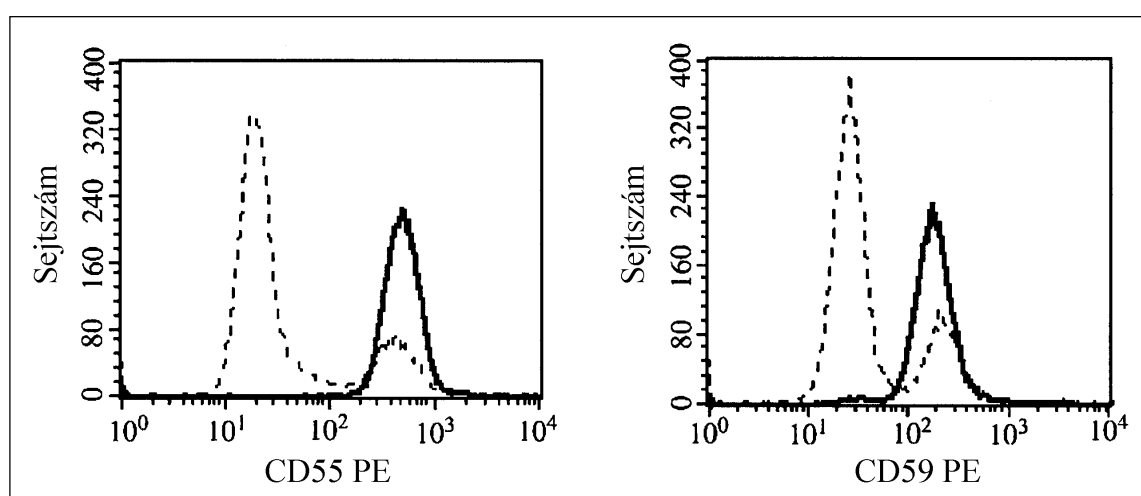
	1. beteg	2. beteg	3. beteg	4. beteg	Ref.tart.
Nem	férfi	férfi	nő	nő	
Hemoglobin, g/l	86	109	113	97	120-175
Total bilirubin, $\mu\text{mol/l}$	63	145	25	50	<17
Konj. bilirubin, $\mu\text{mol/l}$	20	10.6	5.6	7	<4
LDH, U/l	3682	5711	2187	1498	280-460
Haptoglobin, g/l	<0.26	<0.26	<0.26	<0.26	0.5-2.3
Retikulocytá, %	7.2	6.8	3.9	7.9	0.5-1.7

2. táblázat: A 4 PNH-s beteg laboratóriumi paramétereit.

Az áramlási citometriai analízis során a vvt-k vizsgálatát PBS-sel hígított vérmintában végeztük, míg a granulocytá és monocytá vizsgálatot a leukémia tipizálásánál ismertetett módon (Lásd Anyag és Módszer 1-es fejezet). Minden marker esetében PE-vel direkt-konjugált antitesteket használtunk. A sejteket az átlagos fluoreszcencia intenzitásuk (MFI) alapján karakterizáltuk I-es, II-es és III-as csoportba. CD55 és CD59 jelölésnél valamennyi sejtípus esetén 10-es MFI érték alatt neveztük III-as típusúnak. A II-es típusú sejtek esetén az MFI  $34 \pm 11$  volt és I-es típusú sejtek esetén pedig  $280 \pm 150$ . A CD14 marker esetén a III-as típusú sejtek MFI-je  $39 \pm 36$  volt, a II-es típusú nem fordult elő, míg az I-es típusúaké  $2060 \pm 1000$  értéket mutatott. Ezen értékek összhangban vannak a CD14 magasabb expressziójával monocytákon.

A kvantitatív analízist Quantibrite gyöngyök segítségével végeztük, ahol is a gyöngyökre felvitt PE molekulák fluoreszcencia intenzitását viszonyítottuk a sejtek MFI értékeihez. Valamennyi felhasznált antitest monovalens volt és a PE:mAb arány minden esetben 1 volt, mely alapján az antitest kötő kapacitás (ABC) megadható volt. A PNH-s granulocyták karakterisztikus hisztogramján látható ábra (6. ábra) azt mutatja, hogy a

CD55 és CD59 markerek estén a sejtek egy részén nincs GPI-horganyzott fehérje, míg egy részük normál expressziót mutat. A vvt-k esetében az adott markerre negatív sejtek aránya kb 40%-a volt a granulocytáknak és monocytáknak. Ez a jelenség jól ismert PNH esetében és a PNH-s vvt-k szeletív destrukciójával magyarázható. A PNH-s klón nagysága jobban megítélhető a granulocyták és a monocyták vizsgálatával. A korábbi tanulmányok azonban nem vizsgálták a GPI horganyzott fehérjék heterogén expresszióját a normál sejtekhez képest.



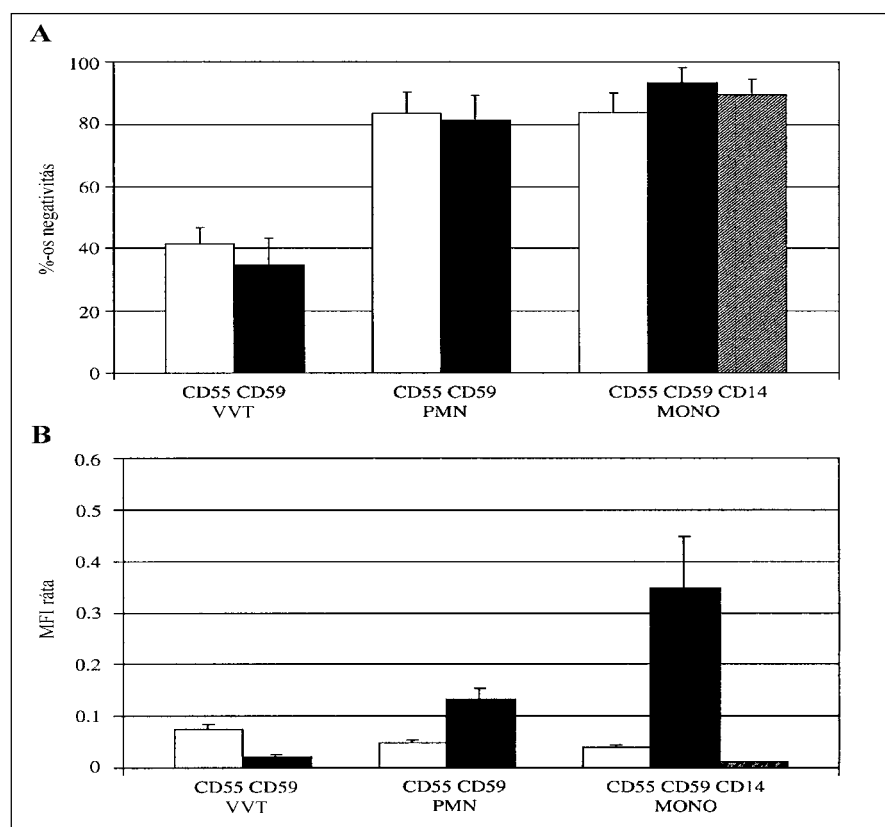
6. ábra: A CD55 és CD59 expressziója a granulocytákon (folytonos vonal: normál minta, szaggatott vonal: PNH-s minta).

Bevezettünk egy új paraméter - az MFI ráta használatát mely a II-es és III-as típusú PNH sejtek és a megfelelő normál populáció MFI-jének hányadosa. Minél kisebb az MFI ráta annál jobban diszkriminál a GPI-anchor marker a negatív és a normál sejtek között. Eredményeink részben alátámasztják azokat a korábbi megfigyeléseket, miszerint az anti-CD55 nem azonosítja olyan jól a kóros vvt populációt, mint az anti-CD59. Az MFI ráta alapján ez numerikusan is igazolható volt, mivel az anti-CD59 esetén jóval alacsonyabb MFI rátákat kapunk (0.011-0.031) mint az anti-CD55 esetében (0.049-0.096).

Valamennyi sejtpopulációban megállapítottuk a %-os negativitás értékét és az MFI rátákat (7. ábra). Korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy PNH esetén a monocyták rendelkeznek a legalacsonyabb GPI-horganyzott fehérje mennyiséggel (Maciejewski, et



al. 1996). A mi eredményeink alapján is az mondható, hogy a monocyta az ideális sejtípus a PNH-s klón méretének meghatározására mivel az MFI ráták itt a legalacsonyabbak (0.007-0.015). Ezért azt ajánljuk, hogy a PNH klón méretének meghatározására a CD14 negatív monocyta %-os értéket adjuk meg az általunk bevezetett MFI rátával együtt.



7. ábra: A CD55 és CD59 valamint a CD14 expresszió vizsgálata a vvt, granulocyta (PNN) és monocyta (MONO) populációkban. Az "A" ábrarész az eredményeket mint %-os negativitás a "B" pedig mint MFI rátát adja meg.

## 2. Akut leukémiák diagnosztikai és prognosztikai módszerei

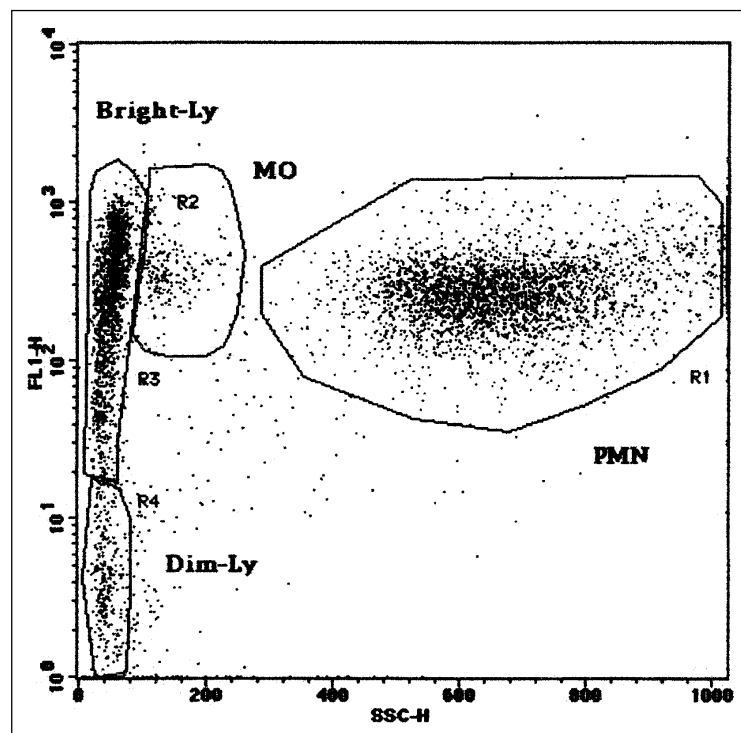
Ebben az alfejezetben az akut myeloid leukémiával (AML) és az akut lymphoid leukémiával (ALL) kapcsolatos celluláris markeranalízisek eredményeit ismertetem, valamint egy rövid részben a malignus hematológiai betegségek családi halmozódásának epidemiológiai analízisét mutatom be.

## 2.1 Sejtfelszíni markerek

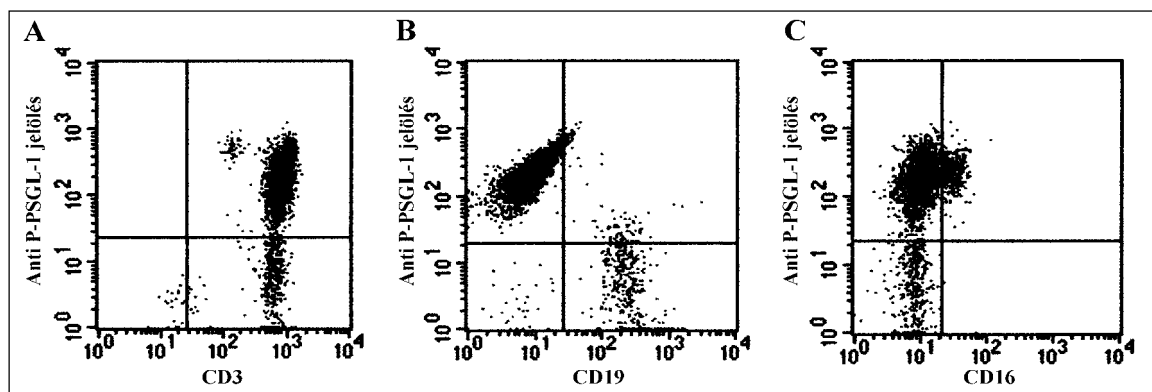
### 2.1.1 A PSGL-1 (CD162) expresszió akut myeloid leukémiában

A leukémiák analízisében olyan diagnosztikailag és prognosztikailag alkalmazható markereket kívántunk vizsgálni, melyek lehetővé teszik adott homogén leukémia populációk finomabb analízisét és differenciáldiagnosztikáját.

A P-selectin glikoprotein ligand 1 (PSGL-1) egy konstitucionálisan expresszált marker myeloid sejtek felszínén, de kimutatható T-sejteken, sőt több nem hemopoiétikus sejten is (Laszik, et al. 1996). Szerepe az, hogy az aktivált vérlemezkek és az aktivált endothel felszínén megjelenő selectinokkal (P-selectin, E-selectin) ligand interakcióba lép és ezzel segíti a sejtek transzendotheliális migrációját, illetve a vérkeringésben heterotipikus aggregátumok kialakulását. A normális perifériás vérben 4 sejtpopuláció volt elkülöníthető a SSC-FL1 plot képeken (8. ábra).



8. ábra: Az FL-1 és SSC dot-plot képe normál perifériás vér leukocytáin indirekt módon történő anti-PSGL-1 jelölés után. Négy sejtpopuláció azonosítható, granulocyta, monocyta, illetve egy bright és dim lymphocyta populáció.

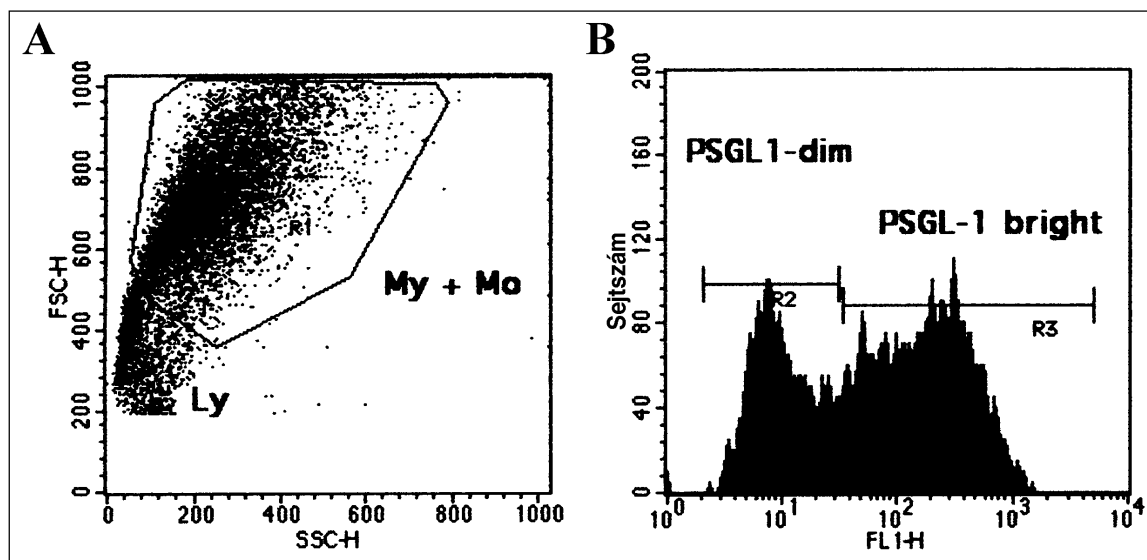


9. ábra: Három színű analízissel vizsgálva a lymphocytákat, kimutatható, hogy a a PSGL-1 bright lymphocyták a CD3+ T-sejtek (A) vagy CD16+, NK-sejtek (C) míg a PSGL-1 dim sejtek CD19+ B-sejtek (B).

A monocyták és neutrophilek mellett két elkülönülő lymphocyta populáció látható melyből a PSGL-1 bright sejtek CD3 és CD16 pozitivitást míg a PSGL-1 dim sejtek CD19 pozitivitást mutattak vagyis az erős expresszió a T- és NK-sejtek, míg a gyenge expresszió a B-sejtek jellegzetessége (9. ábra). A jelölődés a neutrophileken és a monocytákon unimodális volt és az MFI szórása ezen sejteken jóval kisebb mértékű volt, mint a lymphocytákon. A normál minták mellett megvizsgáltuk 20 de novo AML-es betegből származó sejtek PSGL-1 expresszióját is. Az AML-es betegek blast aránya 50-100% között változott és részletes fenotípus eredményeit a 3-as táblázat tartalmazza.

Beteg száma	FAB típus	Minta típusa	CD13 (%)	CD33 (%)	HLA-DR (%)	CD14 (%)	CD34 (%)	Blast arány (%)
1	M1	PV	53	55	55	2	53	45
2	M1	PV	44	72	32	12	36	45
3	M1	PV	75	83	81	6	82	80
4	M1	PV	NT	53	94	NT	NT	65
5	M1	CSV	63	73	39	13	24	40
6	M2	PV	5	64	8	2	6	80
7	M2	PV	65	63	73	6	8	80
8	M2	CSV	81	56	48	14	29	65
9	M2	CSV	82	88	65	6	42	48
10	M4	PV	62	66	24	5	4	53
11	M4	PV	85	63	82	14	59	50
12	M4	PV	89	92	84	68	2	100
13	M4	PV	84	83	84	4	14	70
14	M4	PV	50	90	50	26	43	85
15	M4	PV	57	83	86	62	16	100
16	M4	CSV	90	88	80	18	71	68
17	M4	CSV	70	81	41	25	5	36
18	M5	PV	83	81	76	23	53	67
19	M5	PV	35	91	45	26	2	100
20	M5	PB	82	86	75	74%	1%	84

3. táblázat: A de novo AML-es minták fenotípusa (CSV: csontvelő, PV: perifériás vér, NT: nem történt).



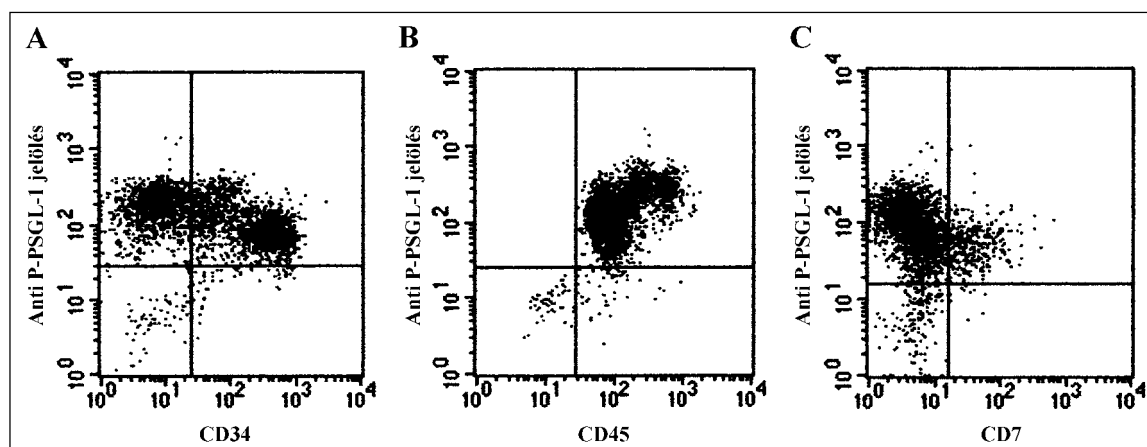
10. ábra: De novo AML M4 esetén a myeloid sejtek (monoblast és myeloblast) dominálnak és alig mutat-  
ható ki lymphoid elem (A). A myeloid sejteken bimodális jelölődés látható PSGL-1-re.

Az AML-es blastok PSGL-1 expressziója általában unimodális eloszlást mutatott, kivéve az AML M4 esetén, ahol a myeloblastok és monoblastoknak megfelelően bimodális eloszlást találtunk (10. ábra). A PSGL-1 dim sejtek kisebb FSC-SSC míg a PSGL-1 bright sejtek nagyobb FSC-SSC értékeket mutattak, mely megfelel a myeloblast és monoblast fényszórási karakterisztikumoknak. A korábban ismertetett kvantitatív analízis segítségével meghatároztuk az antigén expresszió mértékét 20 normál és 20 AML-es mintán (4. táblázat).

	ABC (átlag $\pm$ SD)	az MFI variációs koefficiense (%)
Neutrophilek	26500 $\pm$ 4500	17
Monocyták	47200 $\pm$ 9900	21
T- és NK sejtek	38200 $\pm$ 26000	68
B sejtek	2600 $\pm$ 1500	58
AML blastok	12000 $\pm$ 5300	44
Monoblastok, Promonocyták	41000 $\pm$ 20300	51
Promyelocyták Myelocyták, Metamyelocyták	19000 $\pm$ 7100	37

4. táblázat: Normál perifériás vér leukocytái és az éretlen myeloid sejtek PSGL-1 jelölődése kvantitatív áramlási citometriával vizsgálva.

Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy a monocyta leukémiákban a PSGL-1 expresszió meglehetősen nagy szórást mutatott, de szignifikánsan nem különbözött az érett monocytáktól ( $p=0.084$ ), míg az AML M1-ben és AML M2-ben megjelenő blastokon a PSGL-1 expresszió mértéke jelentősen csökkentnek adódott, mely szignifikánsan alacsonyabb volt mint a neutrophilek PSGL-1 expressziója ( $p < 0.001$ ). Három színű analízisben vizsgálva a PSGL-1 expressziót azt találtuk, hogy a PSGL-1 jelölődés koexpressziót mutat a CD45 jelölődéssel és fordítottan korrelál a CD34 és a CD7 expresszióval ami azt jelzi, hogy a sejtek érettségével az expresszió mértéke növekszik (11. ábra).



11. ábra: AML M2 esetén a PSGL-1 jelölődés 3 színű analízissel történt. Mindegyik képen a függőleges tengelyen a PSGL-1 jelölődés látható, míg a vízszintes tengelyen a CD34 (A), a CD45 (B) és a CD7 (C).

Az immunfenotipizálás az ALL-ek esetében igen jól hasznosítható vizsgálat, de AML esetében a vizsgálat értékelhetősége gyakran limitált. A kvalitatív eltéréseken kívül a sejtfelszíni receptorok aktuális száma is megadható, amint azt a korábbiakban ismertettük. Korábbi vizsgálatokban, hasonló módszert alkalmazva jó néhány receptor mennyiségét meghatározták normál és leukémiás mintákon (Bikoue, et al. 1996, D'Arena, et al. 2000, Porwit-MacDonald, et al. 1996). Ezen kísérletsorozatban elvégzett vizsgálatok megbízhatóságát mutatja az, hogy a normál neutrophilek és monocyták esetén kapott sejtfelszíni receptorszám gyakorlatilag megegyezett a korábban radioligand assay-vel

kapott értékekkel (Ushiyama, et al. 1993). A PSGL-1-et már korábban több tanulmányban vizsgálták különböző sejtek felszínén (Laszik, et al. 1996, Vachino, et al. 1995), de először mi kvantitáltuk ezen receptort normál és leukémiás sejteken. Fontos volt, hogy a kísérletekhez olyan antitestet használjunk, amely egy megfelelő epitópot ismer fel a receptoron. A vizsgálatainkhoz alkalmazott PL-1 antitest ideális mivel a PSGL-1 egyik distalis epitópja ellen irányul. Az eredmények értékelésénél azonban tudni kell, hogy a PSGL-1-nek megfelelő poszttranszlációs módosításokon kell átmennie, hogy ligandkötésre legyen képes és így a kapott receptorszám nem feltétlenül jelez funkcionáló receptort. Azonban korábbi tanulmányok (Tracey and Rinder 1996) azt találták, hogy a CD34 pozitív progenitor sejtek felszínén kimutatható PSGL-1 megköti az aktivált thrombocytákat így valószínűleg ebben az esetben egy funkcionáló receptorról van szó. A myeloid és különösen a monocyta differenciálódás gyakran nem jár együtt megbízhatóan identifikálható markerek expressziójával. A leggyakrabban használt CD14 marker sokszor negatív AML M4 és M5 esetében, de megjelenhet M1-ben és M2-ben is. Mi azt találtuk, hogy a myeloblastok és a monoblastok között nincs átfedés a PSGL-1 receptorszámot illetően, azt gondoljuk, hogy a PSGL-1 kvantitálása alapján jól elkülöníthető ez a két leukémiás sejtípus.

### 2.1.2 A P-glikoprotein vizsgálata

A sejtfelszíni markerek egy része igen fontos funkcionálisan, de az antigén expresszió mennyisége nem teszi lehetővé, hogy megfelelő szenzitivitással ki lehessen mutatni direkt konjugált antitestekkel az áramlási citometriai vizsgálatokban. Az egyik ilyen sejtfelszíni protein a P-glikoprotein (Pgp), mely egy 170 kD tömegű ABC (ATP-binding cassette) fehérjék közé tartozó protein, melynek jelentős szerepe van a xenobiotikumok eltávolításában. Mivel a fehérjének számos - a daganatos betegek kezelésében haszná-

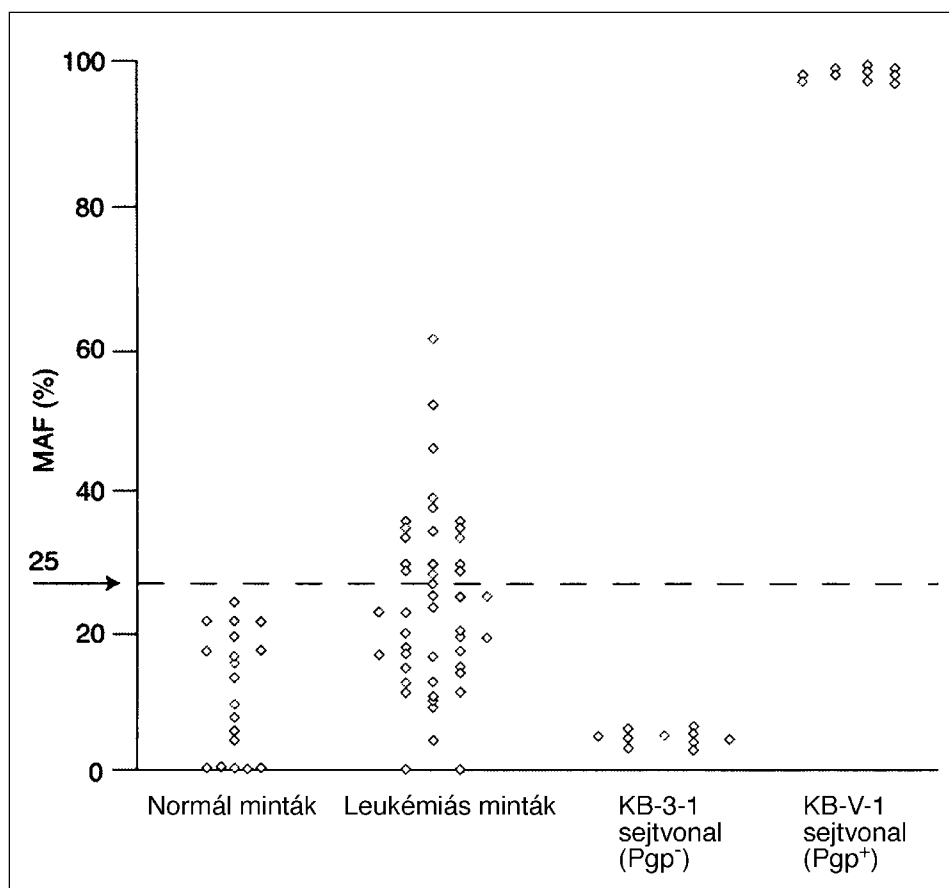
latos - szer szubsztrátja, így ezen betegekben a kezelés során rezisztenciát okozhatnak pl. vinca alkaloidák (vinblastin), epipodophyllotoxinok (etoposid) vagy egyéb pl. mytomycin, Taxol, topotecan kezelés során. Mivel a Pgp több citosztatikummal szemben is rezisztenciához vezet, ezért a Pgp-t a multidrog rezisztencia (MDR) kialakulásában az egyik legfontosabb fehérjének tartják (MDR-1). A Pgp ugyan nem kizárólagos fehérje a multidrog rezisztencia mechanizmus kialakulásában, de igen jelentős amit az is mutat, hogy több nemzetközi tanulmányban megpróbálták az MDR-1 fehérje aktivitását blokkolni, hogy a terápiás hatékonyságot javítsák (Ghetie, et al. 1999, Maia, et al. 1996, Sonneveld 2000, Thomas and Coley 2003). Az MDR vizsgálata során a Pgp analízis alapvetően 3 különböző módszerrel történhet, a Pgp antigén kimutatásával, a Pgp aktivitás vizsgálatával és a Pgp mRNS kimutatásával. A korábbi konszenzus ajánlás az volt, hogy az MDR vizsgálata klinikai mintákon legalább 2 módszerrel történjen. Kísérleteinkben megvizsgáltuk az antigén kimutatás és egy Pgp funkcionális teszt – a calcein assay- szenzitivitását. Azt találtuk, hogy a calcein assay-vel a KB-V1 MDR+ sejtvonalon a MAF érték közel 100%-os volt és a sejtek 500 000 Pgp molekulát tartalmaztak, míg a KB-8-5 sejtvonalon mely szintén MDR pozitív, de csak 30 000 Pgp molekulát expresszál, a MAF értéke még mindig nagyon magas (80%-os) volt. A klinikai minták esetén pedig az antigén expresszióval nem lehetett különbséget tenni olyan esetben sem amikor nyilvánvaló eltérés volt MDR aktivitás tekintetében a klinikai minták között (5. táblázat).

Sejtvonal/minta	MAF (%)	ABC
KB-V1	98	500,000
KB-8-5	80	30,000
AML-es minta	32	<2500
Normál minta	9	<2500

5. táblázat: A Pgp antigént ABC értékekben adtuk meg indirekt kvantitatív áramlási citometria segítségével.

A MAF formájában kifejezett MDR aktivitás jól dichotomizálta az MDR- és MDR+ sejtvonalakat és 25%-os érték alatt aktivitást adott normál minták esetén, míg a leukémiás mintákban 0 és 62% közti MAF volt kimutatható (12. ábra).

A Pgp funkcióját lehetőség van a korábban ismertetett antigén analízissel is meghatározni. Ennek egy igen jól érzékenyített módszere az amely során a Pgp konformációs változását mutatjuk ki különböző revertálószerekkel történt kezelés előtt és után. Az adott Pgp elleni antitest klón (UIC2) kötődésében való eltolódást (shift) vizsgáló teszt az UIC2 shift tulajdonképpen már egy funkcionális teszt és ilyen értelemben alkalmas lehet klinikai vizsgálatokra is.



12. ábra: A MAF cut-off értéke, 20 normál, 50 leukémiás mintán és 10-10 ismételt mérés KB3-1 és KBV-1 sejtvonalakon.

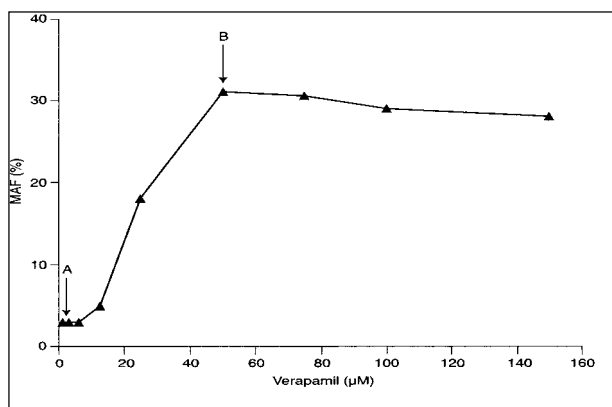


### 2.1.2.1 A calcein assay beállítása

Ahhoz hogy a MAF vizsgálatot rutindiagnosztikai tesztként alkalmazni tudjuk, a mérési kritériumokat ki kellett dolgozni olyan formában, ahogy az a rutin klinikai laboratóriumi eljárásoknál szokásos. Ehhez a következő vizsgálatokat végeztük el.

Az assay komponenseinek stabilitását megvizsgáltuk 4°C-on és -20°C-on történő tárolás során 12 hónapon át. A MAF értékeket MDR+ sejtvonalakon teszteltük 0, 1, 3, 6 és 12 hónap után és ugyanezen időpontokban a calcein-AM fluoreszcenciáját Perkin Elmer fluoreszcens spektrofotométerben vizsgáltuk 488 nm-es excitációs és 525 nm-es emissziós hullámhosszon. Azt találtuk, hogy a verapamil törzsoldat (8 mmol/L, HBSS-ben tárolva) mindkét vizsgált hőmérsékleten eltárolható a gátló aktivitás megváltozása nélkül. A calcein-AM (100  $\mu$ mol/L, DMSO-ban) 12 hónapig -20°C-on eltárolható, de jelentős - hidrolízis miatti- fluoreszcencia növekedés volt tapasztalható 4°C-on.

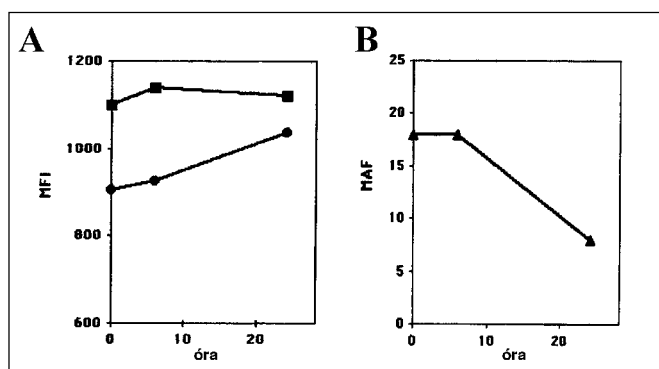
Az optimális verapamil koncentráció megállapítása azért fontos, mert ha a revertálószer koncentrációja nem éri el a kellő mértéket, akkor suboptimálisak a mérési körülmények, míg túl magas revertálószer koncentráció a sejtekre toxikus lehet. Ezért AML-es mintákon végeztük el a MAF értékek verapamil függésének vizsgálatát. Azt találtuk, hogy 50  $\mu$ mol/L-es verapamil koncentráció megfelelő mértékű gátlást eredményez, míg magasabb koncentrációknál a MAF értékek csökkennek (13. ábra).



13. ábra:

A Verapamil ideális gátló koncentrációjának meghatározása. Az MDR aktivitást mint MAF érték fejeztük ki egy AML-es beteg mintáján. A mononukleáris sejteket verapamillal inkubáltuk 5 percig, majd calcein-AM-et adtunk hozzá és 10 perc inkubáció után leállítottuk a reakciót és az MFI értékeket meghatároztuk. A verapamil terápiás tartománya 0,2-1,1  $\mu$ mol/l (A) mely két nagyságrenddel alatta marad az ideális gátlókoncentrációnak (B).

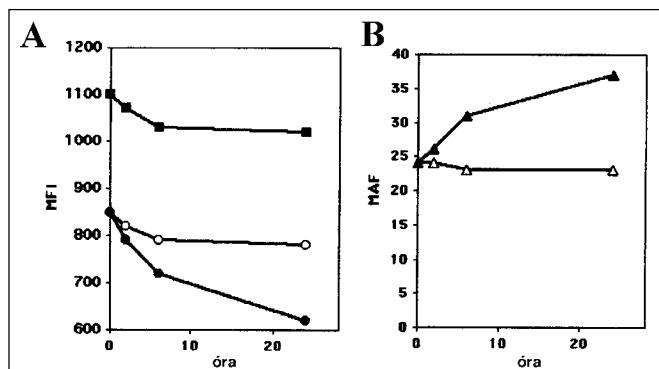
A harmadik olyan vizsgálatsorozat mely a módszer beállításához elengedhetetlen, annak kimutatása volt, hogy milyen formában és mennyi ideig tárolhatók a minták MDR vizsgálatra, különös tekintettel arra, hogy itt egy funkcionális tesztről van szó. A funkcionális tesztek intakt élő sejteket igényelnek és ellentétben a fixált sejteket alkalmazó antigén meghatározásokkal, metabolikusan aktív sejtekre van szükség. Mivel az áramlási citometriai diagnosztikai vizsgálatokhoz a minták 24 órán át szobahőn tárolhatók, mi teljes csontvelő és perifériás vérmintákat, valamint szeparált mononukleáris sejteket 24 órán keresztül tároltunk és megvizsgáltuk MAF aktivitásukat. Azt találtuk, hogy a 6 órán át szobahőn tárolt csontvelői és vérminták még megfelelő MAF értéket mutatnak, viszont a 24 óra után a MAF érték jelentősen csökken. Ezen mintákban a propidium jodid pozitivitás minimális volt, de az ATP depléciónak miatt az efflux hatékonysága romlott és a Vp- mintákban magasabb MFI értéket kaptunk mely az alacsonyabb MAF értéket eredményezte (14. ábra).



14. ábra: Teljes csontvelői mintát analizáltunk 0, 6 és 24 óra tárolás után. A Vp- minta (kör) MFI értéke jelentősen emelkedett 24 óra alatt, míg a Vp+ minta (négyzet) nem változott (A). Ez jelentős csökkenést okozott a MAF értékekben (B).

A funkcionális tesztek egyik hátránya, hogy rutindiagnosztikai körülmények közt pontosan a vizsgálat kivitelezhetősége miatt nehezen alkalmazhatóak. Eredményeink alapján a calceinnel feltöltött AML-es minták 4°C-on tárolva 24 órán át eltárolhatók anélkül, hogy a MAF érték megváltozna, azonban a szobahőn (23°C-on) tárolt mintákban a MAF értékek emelkedését tapasztaltuk 24 óra múlva, mivel a sejtek a calceint továbbra

is eltávolították a sejtekből és így a Vp- értékek csökkentek, azonban 4°C-on az efflux proteinek megfelelő módon blokkoltak voltak, így nem változott a mért MDR aktivitás (15. ábra).



15. ábra: A Ficoll-on szeparált és calceinnel feltöltött mononukleáris sejtek MFI értéke jelentősen csökkent szobahős tárolásnál (A ábra, teli kör) mely jelentősen növelte a MAF értéket (B ábra teli háromszög), míg a 4°C-on tárolt mintánál csak minimálisan változás volt észlelhető (A és B ábra) üres kör és háromszög.

A rutindiagnosztikai applikáció előtti utolsó vizsgálat a teszt reprodukálhatóságának analízise volt. Egy normál minta, egy AML-es minta és egy MDR+ sejtvonal (KBV1) MAF aktivitását mértük le 10 egymást követő alkalommal (within batch precision). Azt találtuk, hogy a magas MAF aktivitásnál a mérésnek rendkívül alacsony a szórása de a klinikailag releváns MAF értékeknél is elfogadható a reprodukálhatóság (6. táblázat).

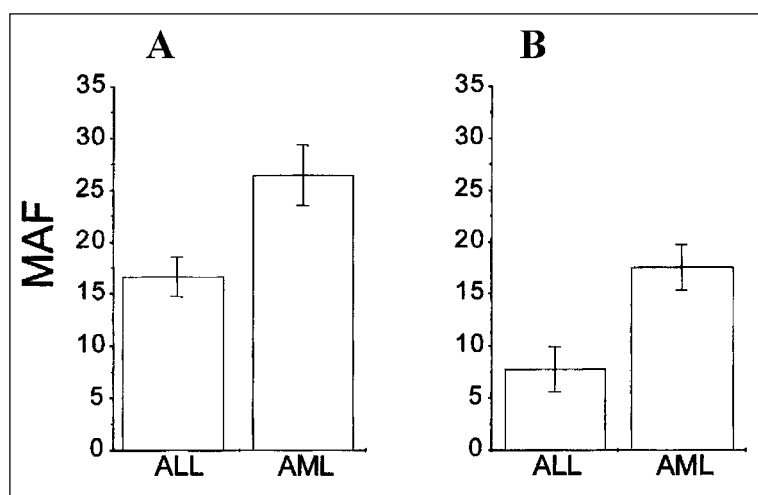
Minta	Átlag MAF	CV (%)
<b>KBV1 sejtvonal</b>	97.9	0.3
<b>AML-es minta</b>	45.8	11
<b>Normál minta</b>	16	13

6. táblázat: A calcein assay reprodukálhatósága.

#### 2.1.2.2. Klinikai minták analízise

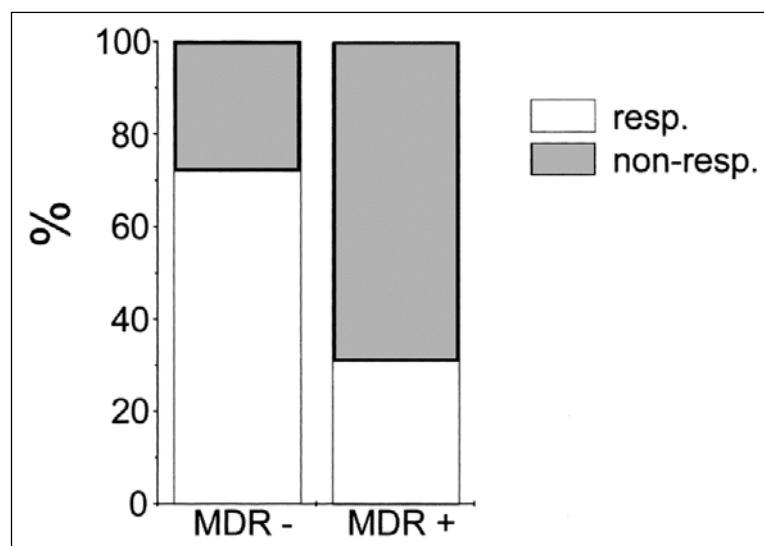
Megvizsgáltunk 93 de novo akut leukemiás mintát (65 AML és 28 ALL) a calcein assay-vel két centrumban, a Debreceni Egyetem Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetében és az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézetben. Mindkét

centrumban azt találtuk, hogy az ALL-ben mért MAF értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak mint az AML-ben mért értékek, de az abszolút MAF értékek a két centrumban kissé eltérőek voltak (16. ábra). Az ALL-ben mért MAF értékek nem különböztek szignifikánsan a normál mononukleáris sejteken kapott MAF értékektől. A betegek egy részénél indukciós kemoterápiával remisszió volt elérhető (reszponderek=R), más részénél nem (non-reszponderek=NR), itt a csontvelői blast arány 5% feletti maradt illetve a perifériás vérben is változó arányban blastok voltak kimutathatók. A calcein assay prognosztikai alkalmazhatóságát AML-ben úgy vizsgáltuk meg, hogy a R és NR csoportban meghatároztuk mindkét centrumban a MAF értékeket, mely az R csoportban 17.1 és 14 míg az NR csoportban 32.9-nek és 23.3-nak adódott.



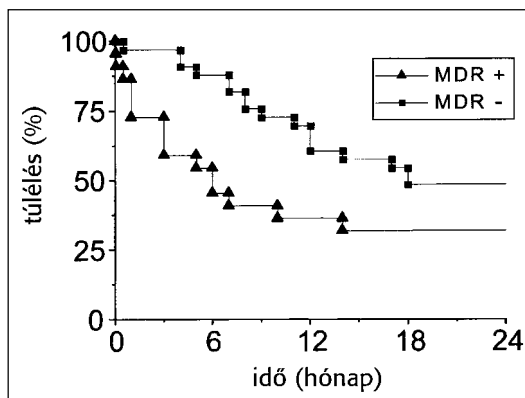
16. ábra:  
MAF értékek összehasonlítása AML-es és ALL-es betegeken a 2 centrumban. Az átlag és a  $\pm$  SEM értékek kerültek feltüntetésre a DE OEC KBMPI-ben (A) és az OHVI-ben (B). Mindkét centrumban az AML-es betegek MAF értékei szignifikánsan magasabbak voltak mint az ALL-es betegeké.

Ezután megállapítottuk a  $MAF_{R+SEM}$  és a  $MAF_{NR-SEM}$  értékeket, mely Debrecenben 25%, Budapesten 20%-nak adódott. Ezen értékek validitását AUC (area under curve) és ROC (receiver operator characteristic) analízissel is ellenőriztük, mely alapján az elérhető legnagyobb szenzitivitást és specificitást ilyen értékeknél találtuk. Ezen cut-off értékek segítségével a 2 centrum betegeinek adatait összevontuk és megállapítottuk, hogy az MDR negativitás 72%-os prediktív értékű volt a kezelés hatásossága szempontjából, míg az MDR pozitivitás 69%-os prediktív értékű a kezelés hatástalansága szempontjából (17. ábra).

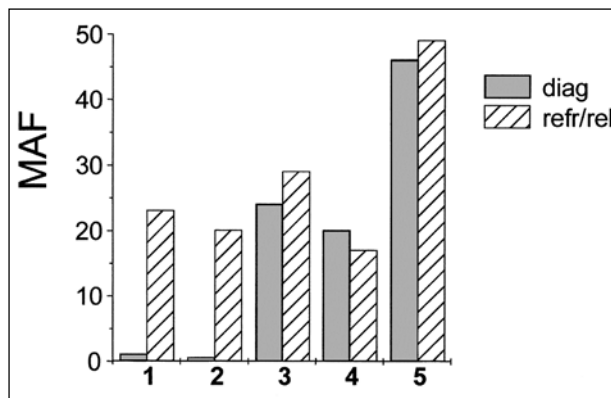


17. ábra: A teszt pozitív és negatív prediktív értéke. A korábban meghatározott cut-off értékek alapján a a betegeket MDR+ és MDR- csoportokra osztottuk. Az ábrán mindkét centrum összesített adatait tüntettük fel. A responderek aránya az MDR- csoportban 72% volt, míg a non-responderek aránya az MDR+ csoportban 69%. Az MDR fenotípus és a kezelésre adott válasz közt szignifikáns korreláció volt ( $p=0.004$ ).

Ha az MDR pozitivitást és MDR negativitást bináris változóként kezeltük, akkor az MDR pozitívítás 5.7x-es valószínűségi hányadost jelentett a terápia hatástalanság szempontjából (95%-os konfidencia intervallum: 1.7-19  $p=0.004$ ). Az MDR aktivitás mellett a vizsgált beteganyagban a betegek életkora jelentett még szignifikáns prognosztikai faktort, minden 10 év életkornövekedés 1.8x-es valószínűségi hányadost jelentett a terápia hatástalanság szempontjából (95%-os konfidencia intervallum: 1.2-2.6  $p=0.005$ ). Az MDR+/MDR- fenotípus analízisét a betegek túlélése szempontjából, olyan esetekben a Kaplan-Meier típusú görbe alapján végeztük, ahol 8 hónap vagy annál hosszabb volt a követési periódus. Azt találtuk, hogy az MDR- esetekből 3x annyi volt az 50%-os túlélési rátát mutatók aránya mint MDR+ esetekben, de a különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket ( $p=0.07$ ) (18. ábra). Szelektált esetekben relapszus során végzett követéses vizsgálatok eredménye alapján azt mondhatjuk, hogy vagy a kezdetben is magas MAF értékek változatlanok maradtak, vagy a kezdetben MDR negatív esetek MDR pozitívvá váltak. Relapszus vagy terápia refrakter esetekben MDR+ → MDR- átalakulást nem találtunk (19. ábra).



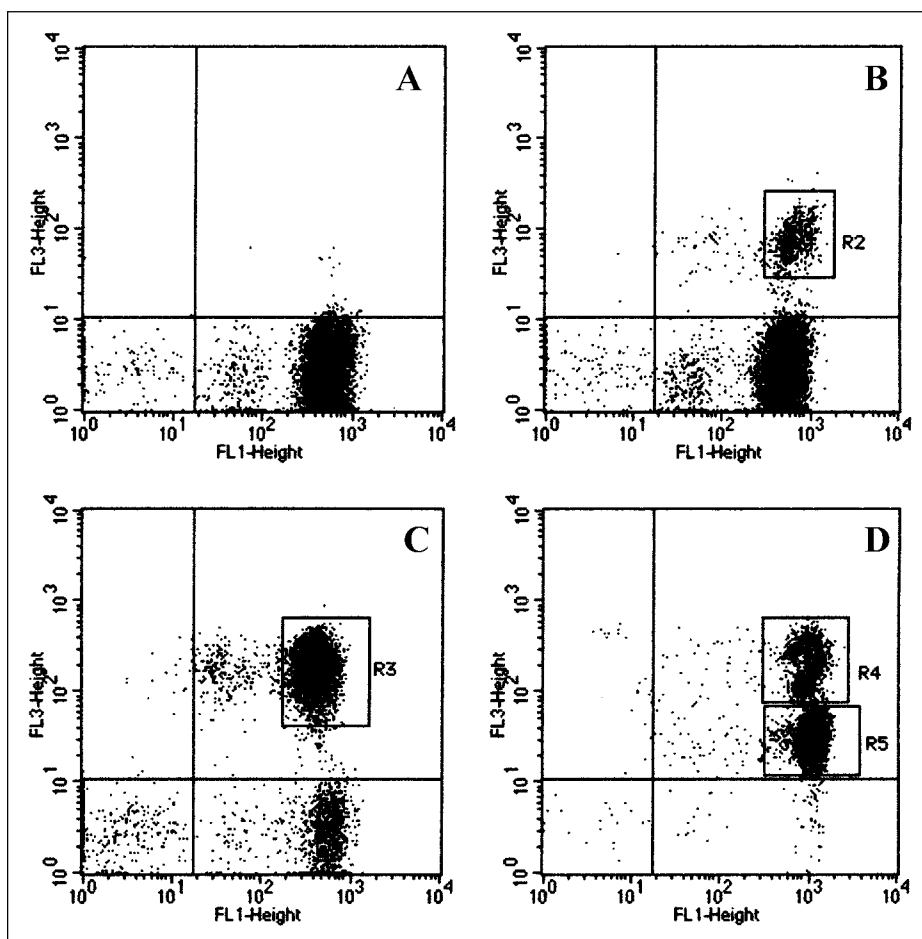
18. ábra: A Kaplan-Meier túlélési görbe 26 MDR+ és 39 MDR- beteg esetén. Az átlagos követési idő 11.7 hónap volt és csak a 8. hónapnál hosszabb túlélésű betegek kerültek feltüntetésre.



19. ábra: Követéses vizsgálatok során néhány betegnél meghatároztuk a MAF értéket a diagnóziskor (diag) és a relapszus vagy terápia rezisztencia során (refr/rel). Kétfajta mintázat volt megfigyelhető: vagy a korábban MDR negatív betegek MDR pozitívvá váltak vagy az MDR+ egyének pozitívak maradtak.

A calcein-AM olyan efflux indikátor, amely kiváló szubsztrátja mind a Pgp-nek mind a - drogrezisztencia szempontjából lényeges másik transzmembrán fehérjének - az MRP1-nek (Legrand, et al. 1999) és így szűrni tud az MDR-t okozó két legfontosabb transzporterre. Ellentétben néhány egyéb – gyakran alkalmazott – indikátorral mint pl. a Rhodamin 123 vagy a Fluo3, a calcein fluoreszcenciája nem függ az intracelluláris környezettől vagy a kötődéstől. Korábbi vizsgálatok alapján (Hollo, et al. 1994, Hollo, et al. 1998, Homolya, et al. 1996) bizonyítottnak vehető, hogy a MAF formájában megadott aktivitási érték megfelelően elkülöníti az MDR+ és MDR- sejteket. Egy további előny, hogy szelektív inhibitorokkal külön-külön vizsgálható a Pgp és az MRP1 (Feller 1995, Holló, 1998, Legrand 1998).

A calcein assay kombinálható felszíni markerrel történő jelöléssel. Ennek azért van jelentősége, mert így megadható azonos fényszórási tulajdonsággal rendelkező különböző eredetű sejtek (pl T- és B-sejtek) MDR aktivitása, illetve elkülöníthető a normál és leukémiás sejtpopulációk MDR aktivitása a CD45 jelölődés intenzitása alapján. Ezen vizsgálatokhoz PerCP jelölést végeztünk a calcein assayt követően az izolált mononukleáris sejteken és sejteket FL1-FL3 dot plot formájában jelenítettük meg (20. ábra).



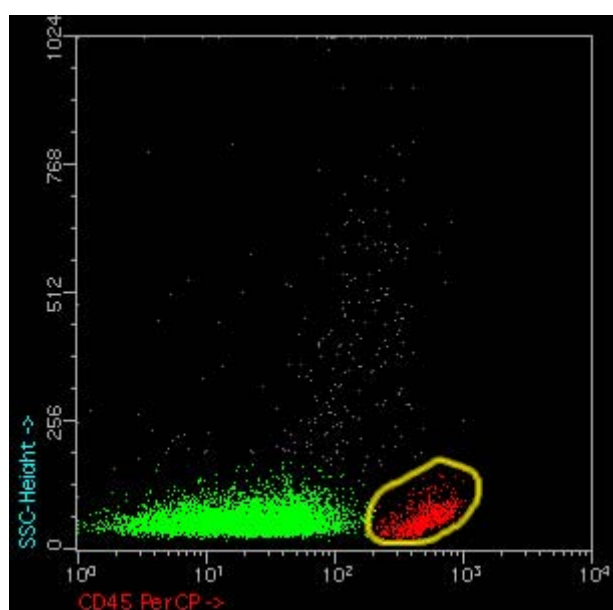
20. ábra: Az FL1-FL3 dot-plot képeken a vízszintes tengelyen a calcein jel, míg a függőleges tengelyen az adott felszíni marker látható, mely által külön megadható a CD19+ sejtek (B), a CD3+ sejtek (C) és a CD45dim+ sejtek (D) MDR aktivitása.

Az MDR aktivitás és a sejtfelszíni markerek kombinációjának jelentősége lehet. Ugyanis a különböző munkacsoportok által kapott értékek összehasonlítása gyakran nem egyszerű, ha nem vesszük figyelembe a normál sejtek aktivitását.

### 2.1.3 A normál lymphocytá mint belső kontroll

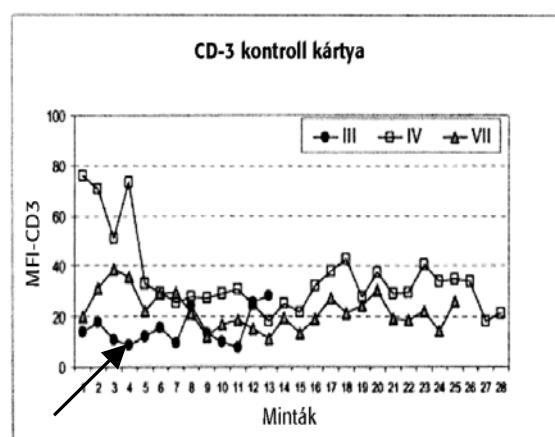
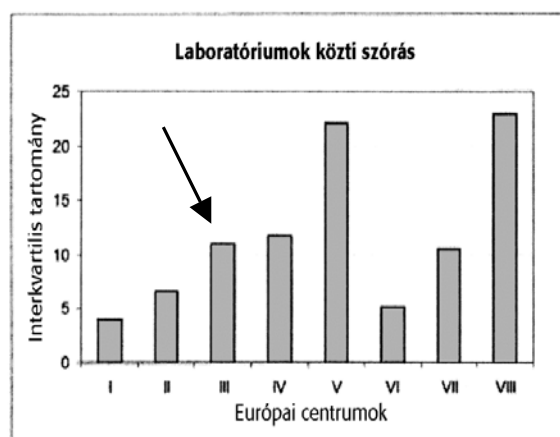
A P-glikoprotein analízishez hasonlóan a sejtfelszíni antigének közül a lymphocytá fenotipizáláshoz leggyakrabban használt markerek, mint a CD3, CD7, CD19 és CD22 nem mutatnak jelentős különbséget a normál lymphocyták és a leukémiás minták reziduális normál sejtjei között. Mi, az Európai Klinikai Sejtanalízis Munkacsoport (European Working Group on Clinical Cell azaz EWGCCA) egyetlen magyar

laboratóriumaként részt vehettünk egy olyan tanulmányban, melyben normál, ALL-es és AML-es csontvelői mintákon vizsgáltuk meg a fenti markerek belső kontrollként való alkalmazhatóságát. A reziduális normál sejteket a CD45-SSC kép alapján azonosítottuk (21. ábra) és meghatároztuk a százalékos pozitivitás arányait reziduális valamint normál sejtek sejtfelszíni fluoreszcenciáit (7. táblázat). A CD3 szórás alapján az szűrhető le, hogy az általunk jelentett eredmények (III) megegyeztek a vezető európai áramlási citometriai laboratóriumok átlagával (22. ábra)



21. ábra:

Az ALL-es minta dot-plot képén jól elkülönülnek a reziduális normál lymphocyták (piros) a myeloid sejtektől (szürke) és a CD45dim+ lymphoblastoktól (zöld).



22. ábra: Az európai áramlási citometriai laboratóriumok között a reprodukálhatóságban az európai átlagot értük el (a KBMPl a III-as laboratórium).



Vizsgált antigén	KBMPI (n=13)	Totál (n=161)
CD19		
% pozitív	18 (16.4)	16 (5.0)
MFI	3.8 (1.8)	5.3 (2.7)
CD22		
% pozitív	21 (15.5)	17 (5.2)
MFI	50.5 (51.5)	36 (18.7)
CD7		
% pozitív	57 (24.5)	66 (26.4)
MFI	6.7 (4.8)	7.4 (4.2)
cyCD3		
% pozitív	56 (25.2)	65 (21.7)
MFI	15.3 (6.8)	21.5 (11.2)
CD7/cyCD3		
% pozitív	1.1 (0.2)	1.0 (0.1)
CD19/CD22		
% pozitív	0.9 (0.2)	1.0 1.8
cyCD3/CD19		
% pozitív	5.4 (4.0)	6.7 (6.3)

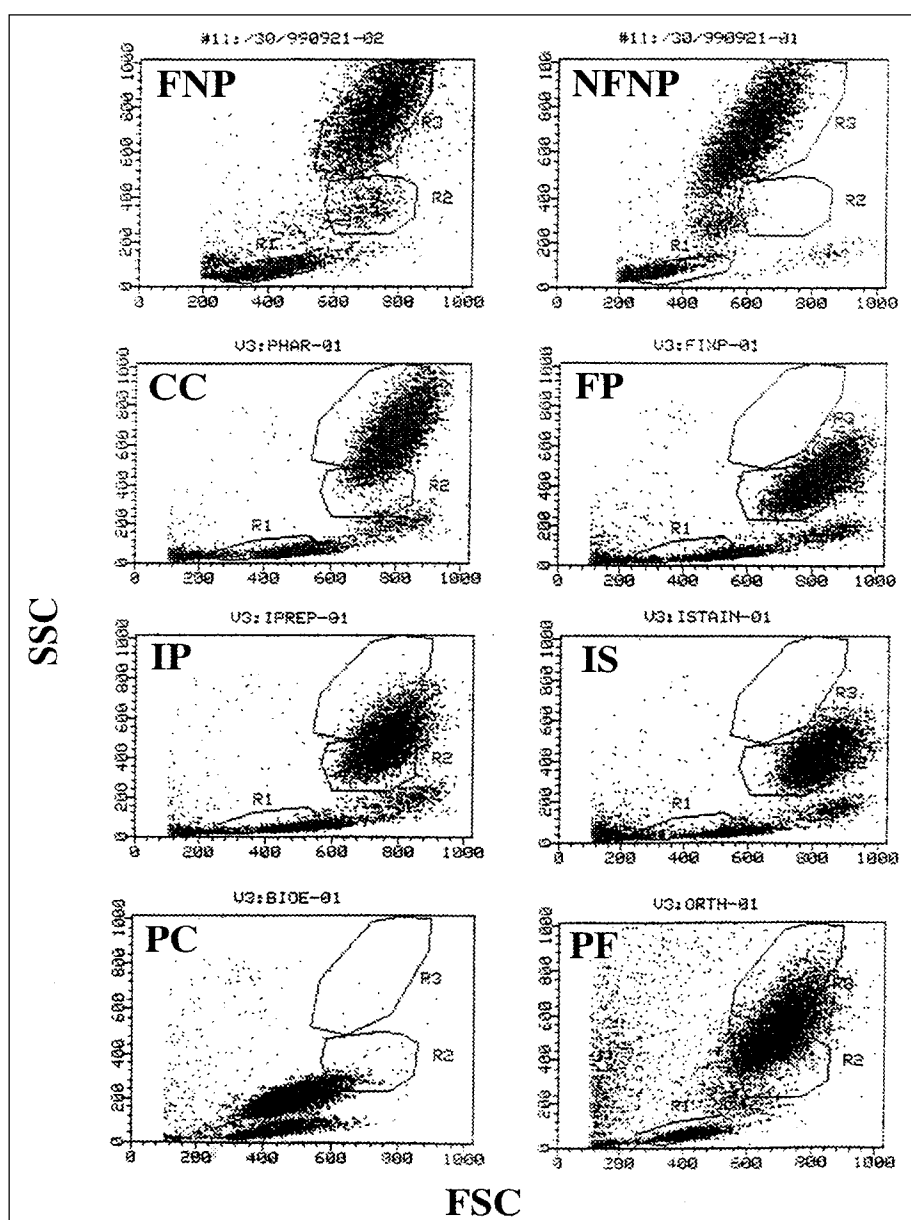
7. táblázat: A laboratóriumok közötti összehasonlításban csak a KBMPI és az össz eredményeket tüntettük fel. A táblázat az átlag és (SD) eredményeket tartalmazza.

## 2.2 Intracitoplazmatikus markerek

### 2.2.1 Permeabilizálási technikák vizsgálata

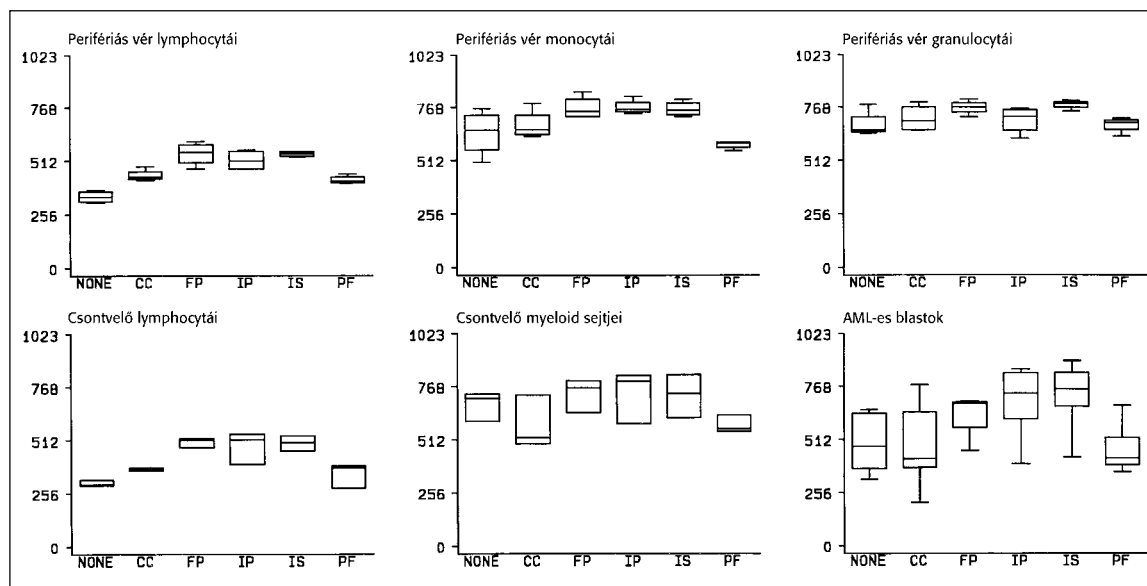
A leukémiákban a legkorábbi markerek azonban nem a sejtfelszínen, hanem intracellulárisan helyezkednek el és lehetnek intracitoplazmatikusan, mitochondriálisan vagy nukleárisan elhelyezkedő fehérjék. Diagnosztikai szempontból, illetve a sejtvonal (lineage) meghatározása szempontjából az intracitoplazmatikus fehérjéknek van a legnagyobb jelentősége, míg a mitochondriális proteinek (pl. bcl-2) illetve a nukleáris antigének (TdT) inkább prognosztikai jelentőségűek illetve a sejtek érettségének jelei. Ahhoz azonban, hogy az intracellulárisan elhelyezkedő antigéneket megbízhatóan ki tudjuk mutatni, a sejteket először permeabilizálni kell. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a különböző permeabilizáló kitek közül melyik az, amely megbízhatóan alkalmazható fényszórás és autofluoreszcencia szempontjából. Megállapítottuk azt is, hogy ugyanazon intracitoplazmatikus marker vizsgálatára létező különböző klónok közt jelentős eltérések mutatkoznak szenzitivitás szempontjából. Normál perifériás vérmintát

különböző permeabilizáló szerekkel kezeltünk és a fényszórási képeket összehasonlítottuk fixált, de nem permeabilizált (FNP) illetve nem fixált nem permeabilizált (NFNP) mintákkal. Azt találtuk, hogy a legtöbb permeabilizáló szer megváltoztatta mind az FSC mind az SSC értékeket de a különböző sejtpopulációk legjobban a Cytofix/Cytoperm (CC), az Intraprep (IP) a Fix and Perm (FP) illetve a Intrastain (IS) permeabilizálóval voltak elérhetőek. A Permeafix (PF) meglehetősen sok törmelékkel eredményezett, míg a Permeacyte (PC) a fényszórási tulajdonságokat durván megváltoztatta (23. ábra).



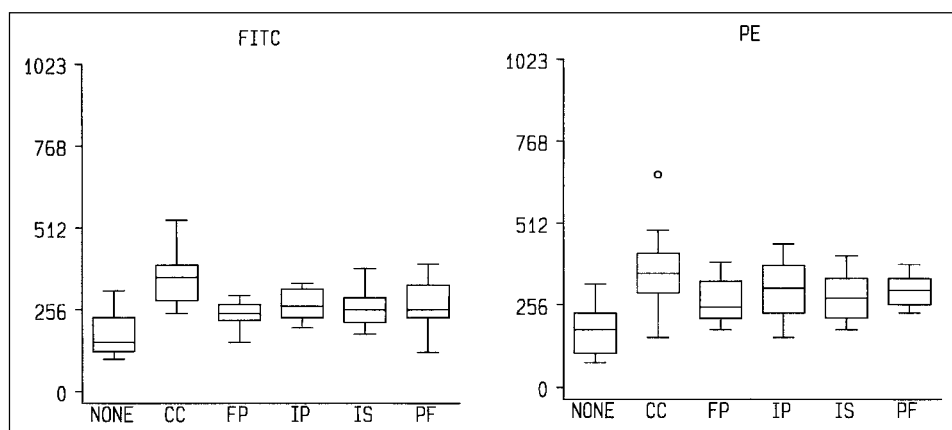
23. ábra: Különböző fixálási és permeabilizálási módszerek hatása az FSC-SSC képre. Minden diagramon a fixált nem-permeabilizált sejtek kapuját tüntettük fel. A rövidítések jelentése az alábbi. NFNP: nem fixált nem permeabilizált, CC: Cytofix/Cytoperm, FP: Fix and Perm, IP: Intraprep, IS: Intrastain, PC: Permeacyte, PF: Permeafix

A fényszórási tulajdonságok közül az oldalszórás (sideward scatter) értékek csökkentek, de még jelentősebb volt az előre szórt fény (FSC) értékek növekedése. Ez mind a normál mintáknál, mind a leukémiás mintákban bekövetkezett (24. ábra).



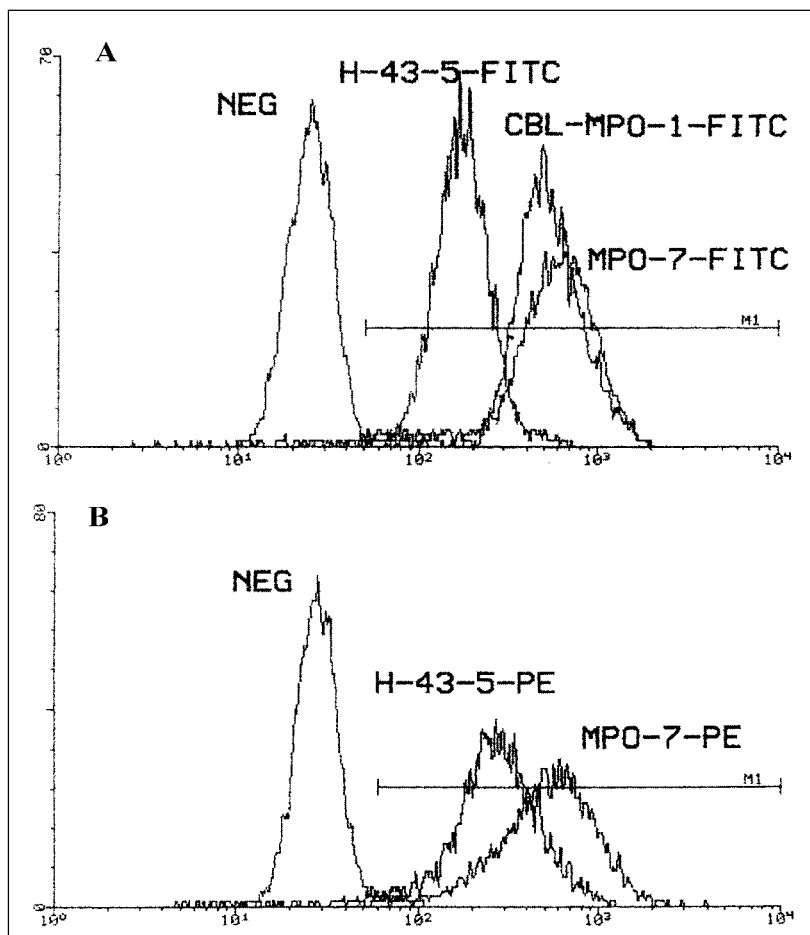
24. ábra: A fixálás és permeabilizálás hatása az FSC jelre, normál és leukémiás mintákon. A Kruskal-Wallis teszt alapján szignifikánsan ( $p=0.0001$ ) különböző eredményeket kaptunk (NONE: Nem permeabilizált minta:, egyéb rövidítések megegyeznek a 23. ábrán lévőkkel).

A különböző permeabilizálási technikák óhatatlanul az autofluoreszcencia növekedéséhez vezethetnek, de ezen belül is feltűnő volt, hogy míg a technikák nagy része mérsékelt növekedést okozott, addig a Cytofix/Cytoperm szignifikánsan magasabb autofluoreszcenciát eredményezett mind az FL1 (FITC) mind az FL2 (PE) csatornán (25. ábra).



25. ábra: A permeabilizálási technikák hatása a sejtek autofluoreszcenciájára valamennyi minta poolozása esetén. Mindegyik permeabilizálási módszer – erősen különböző mértékű – de szignifikáns emelkedést okozott mind a FITC mind a PE csatornán.

Az autofluoreszcenciás jel növekedése megnehezítheti a kis intenzitású, de specifikus jelek elkülönítését. Ez a gyakorlatban ténylegesen is előfordulhat, ugyanis egy adott intracitoplazmatikus antigén (pl. MPO) kimutatására alkalmas antitest klónok közt jelentős eltérés mutatkozott a szenzitivitást illetően (26. ábra).



26. ábra: Egy AML-es mintán látható, hogy a különböző anti-MPO klónok jelentősen eltérő szenzitivitásúak mind a FITC (A) mind a PE (B) fluorophor konjugáció esetén.

Lényeges szempont, hogy az intracitoplazmatikus jelölés kizárólag azon sejteket jelölje, amelyek valódi pozitivitást mutatnak az adott markerre és ne adjon nem-specifikus reakciót. Három különböző intracitoplazmatikus markerre több klont és több permeabilizáló technikát megvizsgálva azt találtuk, hogy kétféle nem-specifikus reakció jelentkezett egy klón és egy permeabilizálási technika függő. Előbbit egy intracitoplazmatikus CD3 kimutatására alkalmas antitest (S4.1) utóbbit a Cytofic/Cytoperm és valamennyi MPO antitest klón esetén figyeltük meg (8. táblázat).

	Fals pozitív (%)				
	Cytofix/Cytoperm	Fix and Perm	Intraprep	Intrastain	Permeafix
CD 79a (HM57)	<1	<1	<1	<1	<1
cyCD3					
UCHT-1	<1	<1	<1	<1	<1
Hit3a	<1	<1	<1	<1	<1
S4.1	7.8	14.9	14.8	14.7	17.9
MPO					
MPO-7	3.6	<1	<1	<1	<1
CBP MPO-1	2.7	<1	<1	<1	<1
H-43-5	5.9	<1	<1	<1	<1

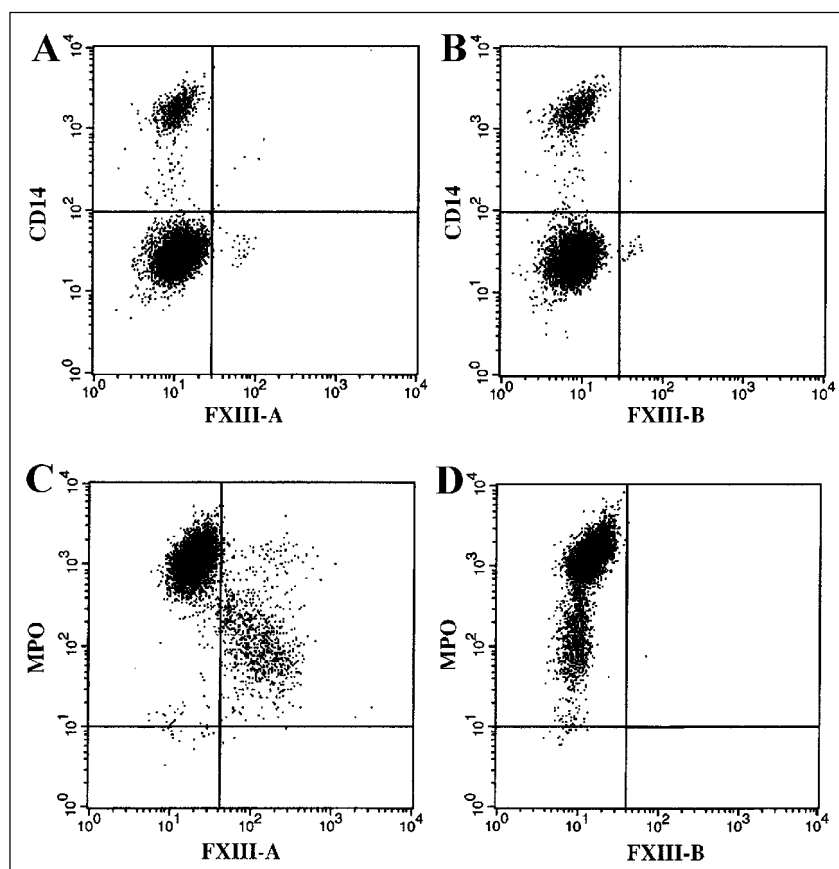
8. táblázat: A fals pozitív százalékok átlagértéke leukémiás mintákon különböző permeabilizáló szerek használata esetén.

Ezen kísérletsorozatban megvizsgáltuk a monoklonális antitest klónok a fluorokrómok és a mintaelőkészítési technikák közti interakciókat. Az eredményeket az alábbi szempontok szerint értékeltük: (i) az FSC és SSC jelintenzitásban bekövetkező változás, mely a kérdéses sejtpopuláció kiválasztásával interferálhat (ii) az autofluoreszcencia érték növekedésének mértéke (iii) a jel specificitásának értékelése (a fals pozitív jelet adó populációk értékelése) és végül (iv) a szenzitivitás megadása (a célpopuláció MFI-jének analízise). Az eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a permeabilizáló reagensek közül az Intrastain (Dako) és az Intraprep (Caltag) mutatta minden tekintetben a legjobb paramétereket és a két permeabilizálási technika között nem volt szignifikáns különbség. A további vizsgálatainkhoz, illetve a rutinszerű alkalmazásra az Intrastain permeabilizálót használtuk. A vizsgálat másik célja a különböző intracelluláris markereket detektáló klónok összehasonlítása volt. Az MPO antitest klónok közül az MPO-7 volt a legszenzitívebb és a PE-konjugátumok jobb szenzitivitással rendelkeztek, mint a FITC-konjugátumok. Miután pl a Cytofix/Cytoperm permeabilizálóval fals pozitivitást is kaptunk, úgy gondoljuk, hogy az MPO detektálásnál kiemelt jelentőségű a megfelelő permeabilizáló és fluorophor kombináció. A cyCD3 kimutatásánál is igen jelentős

különbségek voltak kimutathatók a különböző klónok közt, mely a T-ALL-es minták esetén pl a Hit3a klón esetén fals negativitást is eredményezhetett, ugyanis a leukémiás minták intracelluláris marker jelintenzitása általában alatta marad a normál sejtekének.

### 2.2.2 XIII-as faktor kimutatása AML-ben

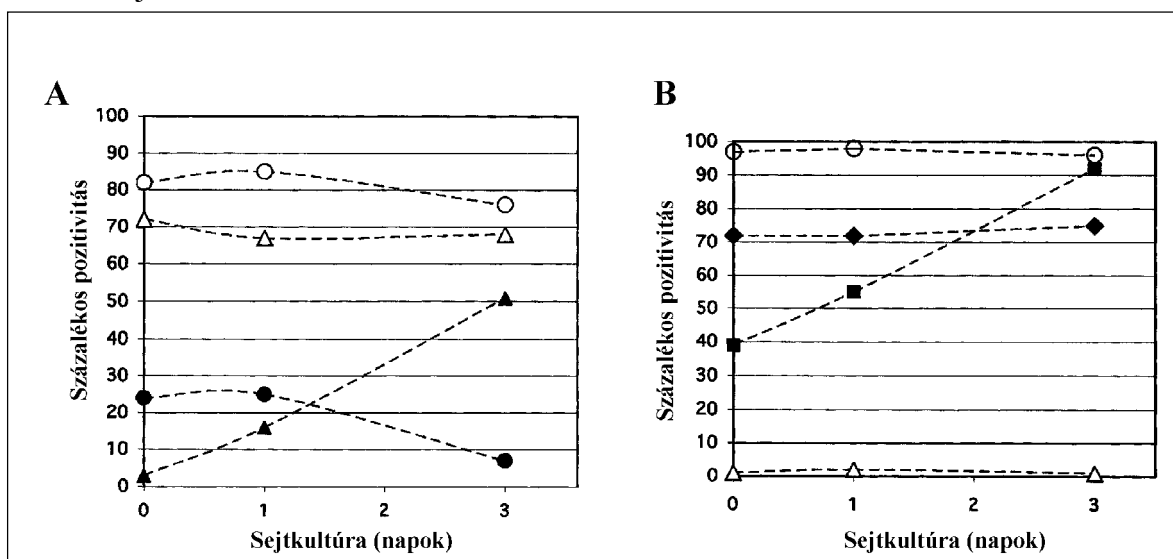
Az előző fejezetben ismertetett optimális permeabilizását alkalmazva a vizsgálatok első részében a XIII-as faktor (FXIII) kimutatását normál perifériás vérmintán végeztük el. Phycoerythreinnel konjugált CD14 (CD14-PE) és FITC-el jelölt FXIII A és B alegység ellenes monoklonális antitestekkel (anti-FXIII-A és anti-FXIII-B) a myeloid kapuban a monocyták CD14-re jelölődtek, de egyik FXIII antitesttel sem kaptunk reakciót, tehát a FXIII nem volt kimutatható a sejtfelszínen. Intrastain-el történő permeabilizálás után az MPO-dim monocyták pozitívak voltak FXIII-A, de negatívak FXIII-B jelölésre (27. ábra).



27. ábra: Normál perifériás vér myeloid sejtek felszíni (A és B) és intracitoplazmatikus (C és D) jelölése anti-FXIII-A és anti-FXIII-B antitestekkel. A függőleges tengelyen a felszíni jelölésnél CD14 az intracitoplazmatikus jelölésnél az MPO látható.

A csontvelőben a myeloid kapuban a FXIII-A két sejtpopulációban volt kimutatható egy CD45bright sejtcsoportban (érett monocyta) és egy CD45dim sejtcsoportban (monoblast). Az átlagos FXIII-A jelölődés a normál csontvelői mintában  $5.7 \pm 1.8 \%$  volt, míg a CD14 jelölődés  $3.6 \pm 0.8 \%$ . A megakaryocyták mivel csak kevesebb mint 1%-ban vannak jelen a normál csontvelőben, nem járulnak hozzá jelentősen a FXIII-A pozitivitáshoz.

A citoplazmatikusan elhelyezkedő FXIII-A-t a monoblast eredetű Mono-Mac6 sejtvonalban már a tenyésztés 0. napjától ki tudtuk mutatni és a tenyésztés teljes időtartama alatt stabilan expresszálódott. A felszíni CD14 kezdetben negatív volt, de D-vitaminnal történő kezelés során már 14 óra után pozitívvá vált. A PLB-985 sejtvonalban a felszíni CD33 és a citoplazmatikus MPO folyamatos expressziót mutatott. DMSO-val történő indukció során CD11b jelent meg a sejtfelszínen, mely a myeloid differenciáció jele, de a FXIII-A negatív maradt. Hasonló eredményeket kaptunk ATRA jelenlétében történő tenyésztés során (28. ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a monoblast sejtvonal már eleve tartalmaz FXIII-A-t, melynek expressziója a differenciáció során tovább már nem nő, viszont a myeloblastok az érési folyamatuk során nem mutatnak FXIII-A jelölődést.

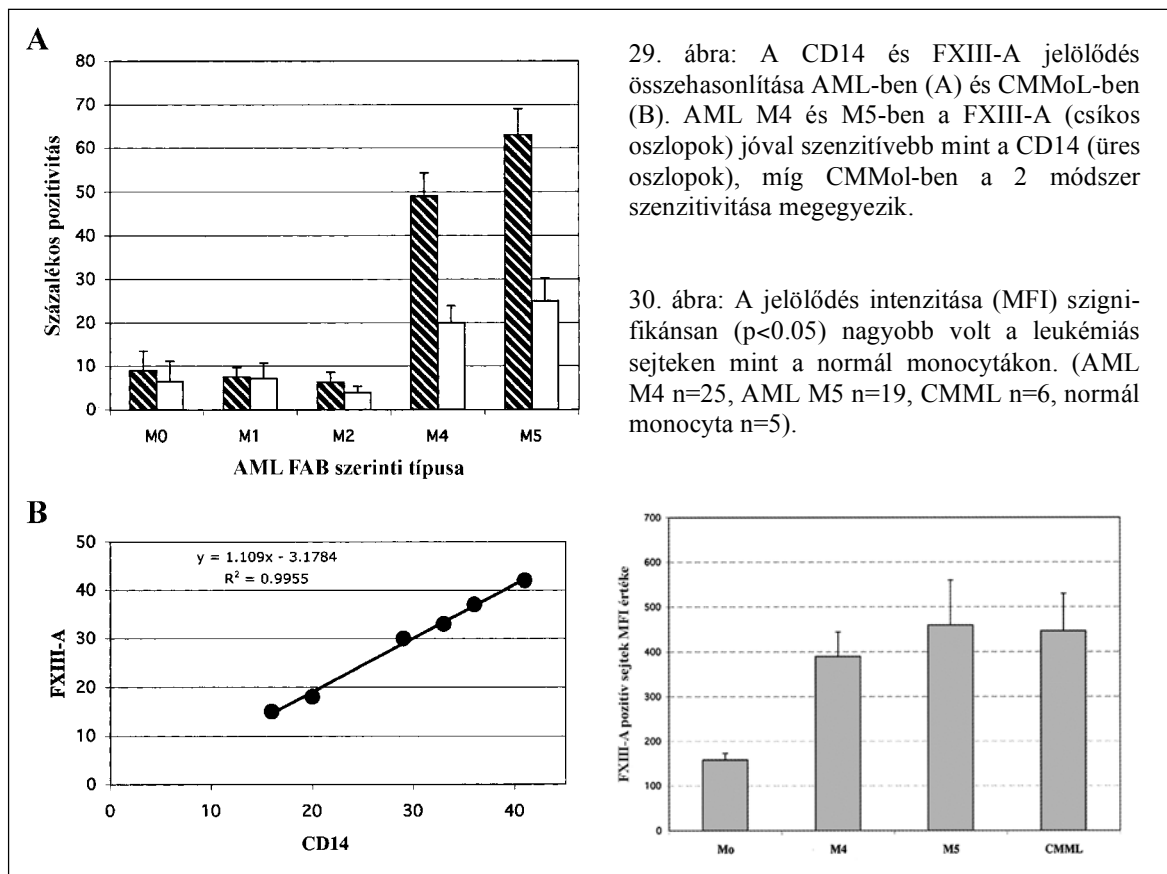


28. ábra: MonoMac6 (A) és PLB-985 (B) sejtek tenyésztése során kapott markerexpresszió. Mindkét sejtvonalban látható, hogy az érés-specifikus antigének megjelentek (fekete háromszög: CD14, fekete négyzet: CD11b). A FXIII-A expresszió (üres háromszög) csak a monocyta sejtvonalban volt kimutatható. Fekete kör: CD64, fehér kör: CD33, fekete rombusz: MPO jelölés.

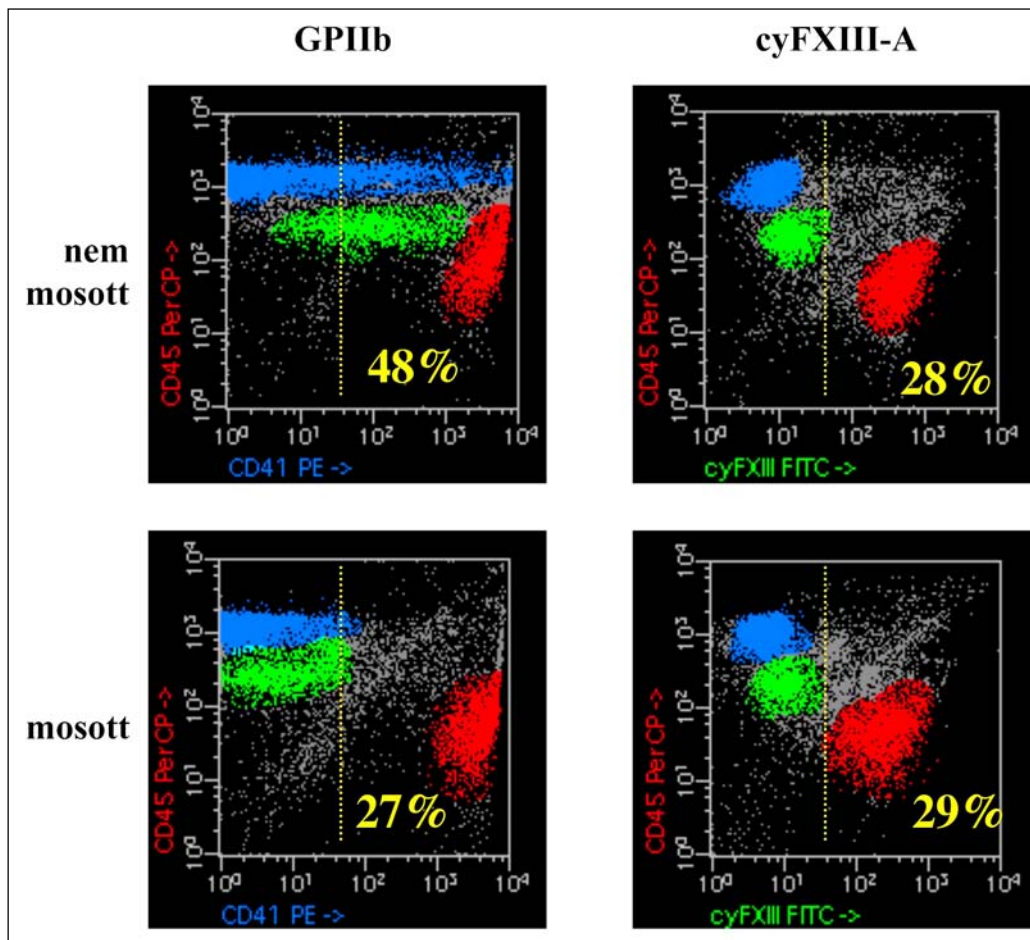
A fenti adatok alapján a FXIII-A egy igen korai markernek tartható, mely a monocyta sejtvonalban megjelenik, de a granulocyta sejtvonalban nem. A további vizsgálatokban 86 de novo AML-es betegből származó csontvelői mintát vizsgáltunk meg és a FXIII-A tartalmú sejteket karakterizáltuk. E mellett 6 CMMoL-es beteg perifériás vérmintáját is analizáltuk. Az M0, M1 és M2 M3 és M6 FAB típusokból származó leukémiás blastok vagy negatívak voltak FXIII-A jelölődésre, vagy a jelölődés mértéke elhanyagolható arányú volt. Akut leukémiák esetén 20%-os jelölődési arány felett tekinthető pozitívnak valamely immunreakció. Ebből a szempontból fontos, hogy a 37 M0, M1, M2, M3 és M6 esetben mindössze 2 esetben kaptunk 20% feletti jelölődést. Az M4 és M5 típusú AML-ekből származó minták dot-plot képein látható, hogy a FXIII-A jelölődés mértéke vagy elérte vagy meghaladta a CD14 pozitivitás értékét. Az AML M4 és M5 FAB csoportokban a FXIII-A pozitív sejtek aránya szignifikánsan meghaladta a CD14 jelölődést ( $p < 0.0001$ ). Ez a különbség főleg az éretlen sejteket mutató esetekben (M5a) volt szembeötlő, itt az átlagos FXIII-A jelölődés 68%-os volt. Az M4 és M5 esetekkel ellentétben a CMMoL mintákban a CD14 és a FXIII-A egyforma százalékos pozitivitást adott, mely arra utal, hogy érettebb sejtek esetén a két reakció azonos populációt jelöl (29. ábra). A myeloblastos és monoblastos leukémiákat összehasonlítva a FXIII-A reakció szenzitivitása 100% volt, a specificitása pedig 95%.

Egy különleges jellegzetessége a FXIII-A jelölődésnek M4, M5 és CMMoL esetén az, hogy a jelölődés intenzitása nagyobb mint a normális perifériás vér monocytái esetén ( $p < 0.05$  mind AML mind CMMoL esetén) (30. ábra). Minden vizsgált M7-es leukémia pozitív volt GPIIb/IIIa-ra. Bár az átlagos FXIII-A pozitivitás alacsonyabb volt mint a GPIIb/IIIa jelölődés mértéke (24% versus 33%), ezen mintákban egy nagyon intenzív FXIII-A jelölődés volt kimutatható.





A valódi megakaryocytá/megakaryoblast arány megállapítása azonban thrombocytá markerek analízise alapján nem mindig egyszerű. AMLM1-M6 FAB csoportokban sőt normál myeloid sejteken is gyakran igen jelentős GPIX, GPIb és GPIIb jelölődés mutatható ki. Erre korábban morfológiai eredmények alapján más szerzők is felhívták a figyelmet (Betz, 1992). Ennek az az oka, hogy Ca-függő módon thrombocyták vagy thrombocytá mikropartikulák tapadnak a myeloid sejtekhez. Mi azt találtuk, hogy megfelelő körülmények között történő EDTA-s mosással ez a fals-pozitív reakció eliminálható. Ilyen körülmények között a thrombocytá glikoprotein analízis eredménye a FXIII-A jelölődéssel megegyező eredményt mutat, mely a valós megakaryocytá arányt adja meg (31. ábra).

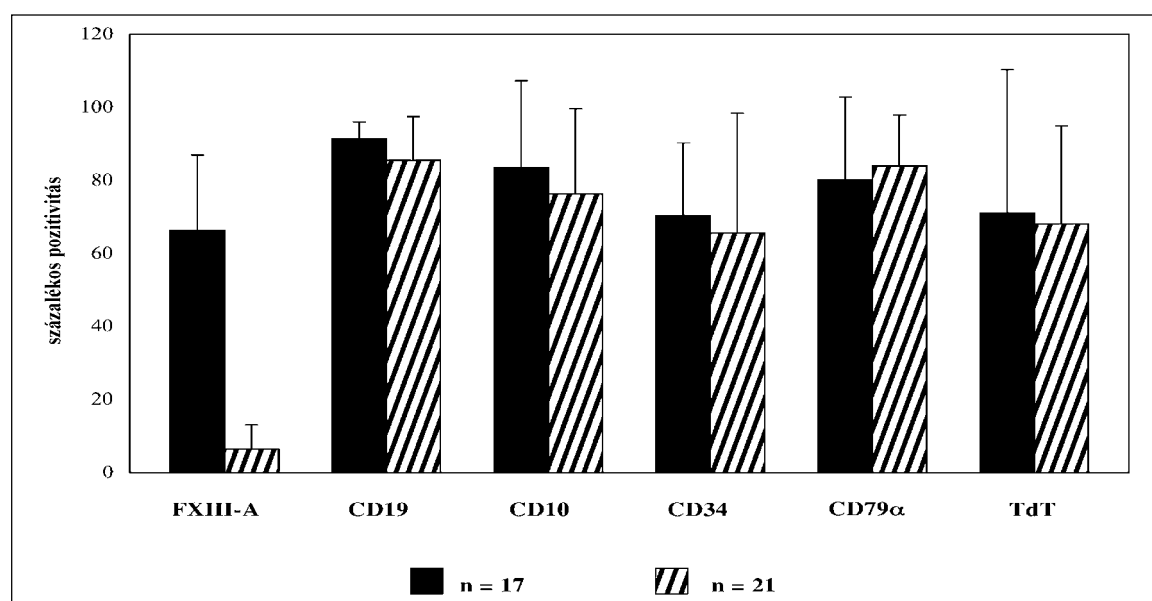


31. ábra: A GPIIb és a cyFXIII-A jelölődési mintázat vizsgálata AML M7 esetén (piros: megakaryocyták, zöld: myeloid prekurzorok, kék: lymphoid prekurzorok).

### 2.2.3 XIII-as faktor kimutatása ALL-ben

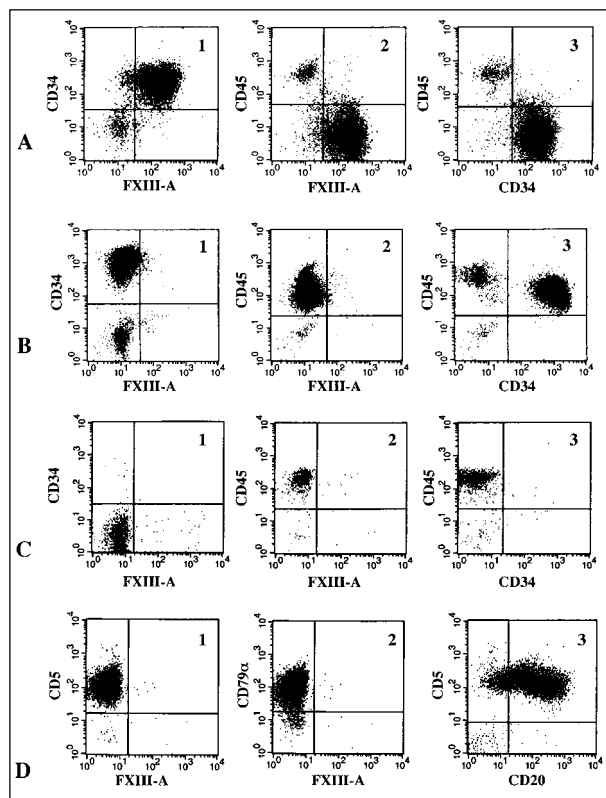
Az akut lymphoid leukémiák (ALL) áramlási citometriai szempontból igen jól karakterizált csoportokra oszthatók. Az ALL-ek nagyobb része B-sejtes és a B-sejtes ALL-eken belül is dominál a common ALL (cALL), melyet a sejtfelszíni CD10 intenzív expressziója és egyidejűleg az intracitoplazmatikus IgM hiánya jellemez. A lymphoblastok B-sejt markereket (CD19, CD22) mutatnak és általában éretlenségi markerekre (CD34, TdT) szintén pozitívak. A fenti fenotípus jellemzőkön túlmenően a B-sejtes ALL-ek gyakran mutatnak aberráns markerexpressziót. Ez lehet myeloid marker pozitivitás (My+ALL) vagy valódi bifenotípusos leukémia, mely kritériumot egy jól definiált pontrendszer alapján lehet kimondani (Buccheri, et al. 1993). Differenciálatlan ALL-ek fenotípus vizsgálata során észleltük először, hogy az ALL-ek egy részében intracelluláris FXIII-A poziti-

vitást találtunk hasonlóan az pl. AML M5 esetekhez. A FXIII-A jelölődés koexpressziót mutatott a lymphoid blastok markereivel (CD19, CD34, CD10, TdT). Három év alatt 47 de novo B-sejtes ALL esetet szisztematikusan megvizsgálva azt találtuk, hogy az esetek 40%-ban kimutatható volt az intracitoplazmatikus FXIII-A pozitivitás. A pozitivitás határértéket 30%-nál meghúzva azt az eredményt kaptuk, hogy a FXIII-A+ esetekben a jelölődés mértéke 66% volt, míg a FXIII-A- esetekben 6.5% (32. ábra).

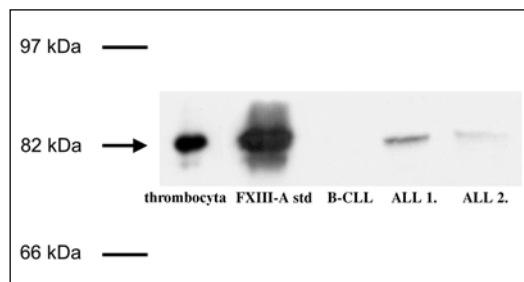


32. ábra: A felszíni és intracelluláris antigének expressziója cALL FXIII-A+ (sötét oszlopok) és FXIII-A- (sávozott oszlopok) csoportjában (pozitivitási cut-off 30%). A FXIII-A jelölődés kivételével nem volt semmilyen eltérés a 2 csoport markerexpressziója között.

A sejtek fenotípusa alapján jól elkülöníthetőek voltak, a pozitív és negatív és FXIII-A+ jelölődés minden alkalommal a lymphoblast populáción volt kimutatható, mely CD45-dim jelölődést és CD34 pozitivitást mutatott. Az érett B-sejtek mint amelyek B-sejtes CLL-ben megjelennek az áramlási citometriai vizsgálat során, valamennyi esetben negatívak voltak FXIII-A jelölődése (33. ábra). A lymphoblastok FXIII-A jelölődése váratlan eredmény volt, így elvégeztük a FXIII-A kimutatását egyéb módszerekkel is, melyeket a továbbiakban részletesen bemutatok.

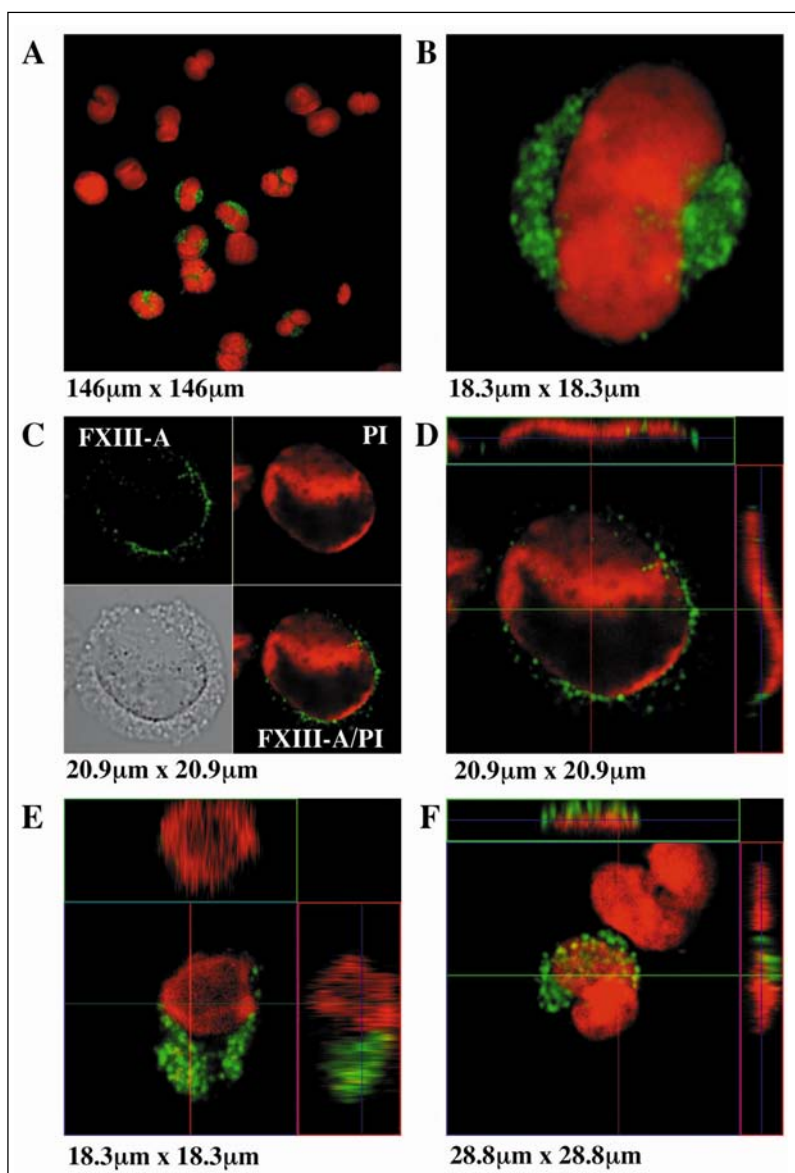


33. ábra: Reprezentatív áramlási citometriai scatter képek FXIII-A+ (A) FXIII-A- (B) normál (C) és CLL-es (D) mintákból. CLL-ben a FXIII-A jelölés mindig negatív volt.



34. ábra: A FXIII-A antigén kimutatása Western-blottal. Két kontroll (thrombocyta és a FXIII-A standard) mellett kimutatható a FXIII-A ALL-es mintákban de B-CLL-ben nem.

A lymphoblastokat EDTA-s mosás során thrombocyta mentesítettük, hogy a vérlemezékben kimutatható jelentős mennyiségű FXIII-A ne zavarjon a mérések során. Ezek után a Módszerek fejezetben részletesen ismertetett módon elvégeztük a FXIII-A kimutatását Western-blotting technikával, mely megerősítette az áramlási citometria eredményeit és a korábban FXIII-A+ esetekben - redukáló körülmények közt - egy 82 kD tömegű protein volt kimutatható (34. ábra). A thrombocyta mentesített lymphoblastokat lizálva meghatároztuk az intracelluláris FXIII-A tartalmat egy olyan - az Anyag és Módszer részben már ismertetett - ELISA rendszerben, mely kizárólag az A<sub>2</sub> alegységet mutatja ki. Ezen vizsgálatok során úgy találtuk, hogy a lymphoblastok 3.1 fg/blast mennyiségben tartalmaznak FXIII-A-t, mely ugyan jelentősen kevesebb a monocytákban kimutatott 37 fg/sejt értéktől, de figyelembe véve a sejtek méretbeli különbségeit, ez a mennyiség nem elhanyagolható.

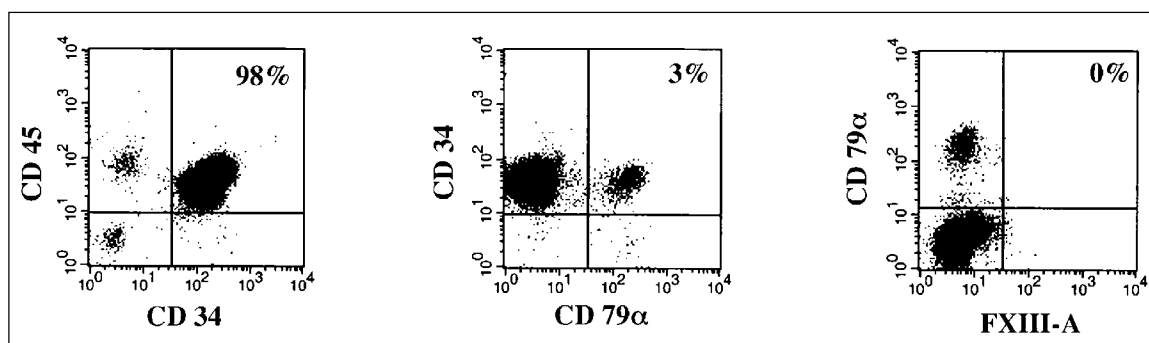


35. ábra:

A FXIII-A kimutatása konfokális mikroszkópiával. A lymphoblastokban (A-E) megjelenő FXIII-A FITC-jelöléssel intracitoplazmatikusan volt kimutatható, hasonlóan a normál monocytákhoz (F). A C ábrarész bal alsó kvadránsában a fáziskontraszt kép látható. A FXIII-A mind a cytospin (D) mind a szuszpenzióban (E) lévő sejteken intracitoplazmatikusan volt kimutatható.

Mivel korábban a FXIII-A-t megtalálták intranukleáris lokalizációban is (Adány, et al. 2001), mi konfokális laser scanning mikroszkópia segítségével megvizsgáltuk különböző síkokban a FXIII-A elhelyezkedését. A kísérletek során azt találtuk, hogy valamennyi esetben a lokalizáció intracitoplazmatikus volt és a korábban a peritoneális macrophagok esetén már leírt (Ádány, et al. 1985) kondenzált festődést mutatta (35. ábra).

Az ALL-ben megjelenő lymphoblastok esetén több módszerrel igazolt FXIII-A expresszió a leukémiás lymphoblastok jellegzetessége, mivel őssejtmobilizáció kapcsán mágneses szeparálással nyert normál CD34<sup>+</sup> B-sejt prekurzorok esetén a FXIII-A jelölődés nem volt kimutatható (36. ábra).



36. ábra. A normál B-sejt precursorokban FXIII-A nem volt kimutatható amint az a mágnesesen szeparált CD34 sejteken látható. A B-sejteket jelölő cyCD79a+ sejtek nem mutatnak FXIII-A jelölődést.

Az eddigi ismereteink szerint a FXIII-A a csontvelőben és a vérben a monocyta/macrophag és a megakaryocita sejtvonalban mutatható ki. A korábbi vizsgálatokban - beleértve saját korábbi adatainkat is - azt találtuk, hogy a normál csontvelői és perifériás vér lymphocyták nem tartalmaznak XIII-as faktort. A FXIII-A megjelenése gyermek- és felnőttkori ALL-ek 40%-ban egy váratlan eredmény volt. A thrombocyták általi potenciális fals pozitivitást áramlási citometriai és mikroszkópos módszerekkel valamint ELISA technikával kizártuk. A FXIII-A+ lymphocyták MFI értéke kisebb volt mint az AML M4 vagy M5 blast sejteké és ELISA vizsgálatokban azt találtuk, hogy a leukémiás lymphoblastok a normál monocytáknál jóval kevesebb FXIII-A-t tartalmaznak (31 fg/sejt és 37 fg/sejt). Azonban az átlagos sejttérfogatok figyelembe vételével - mivel a monocyták térfogata jóval nagyobb - elmondható, hogy a lymphoblastokban a FXIII-A mennyisége nem elhanyagolható.

Mivel ALL-ben gyakran kimutathatók myeloid antigének fontos megjegyezni, hogy a FXIII-A+ ALL-ek nagy részében (a 19 betegből 15-ben) nem volt myeloid marker pozitívitas kimutatható, így elmondható, hogy a FXIII-A pozitívitas ALL-ben egy különleges alcsoportot jelent.

Az aberráns leukemia asszociált fenotípus gyakori eltérés ALL-ben, de eddigi ismereteink szerint egyéb sejtvonalból származó intracytoplazmatikus marker leírására még nem került sor. Nem ismert a XIII-as faktor intracelluláris szerepe. Feltételezik

szerepét fagocitózisban (Sarvary, et al. 2004), macrophagok alternatív aktivációjában (Torocsik, et al. 2005), de leírták proangiogén hatását is (Dardik, et al. 2005). További vizsgálatokat végzünk annak kiderítésére, hogy a FXIII-A+ betegek prognosztikailag külön csoportot jelentenek-e.

### ***2.3 Epidemiológiai elemzés familiáris leukémiákban***

A fenotípus vizsgálatok során az elmúlt 12 évben több mint 6000 malignus hematológiai betegség gyanúval küldött esetet analizáltunk. A nyíregyházi Jósa András Kórház munkatársaival közösen a morfológiai, citokémiai és fenotípus vizsgálatok alapján 20 év anyagát dolgoztuk fel a familiárisan előforduló leukémiák szempontjából, mivel számos betegnél megfigyelhető volt a malignus hematológiai betegség családi halmozódása. Ilyen jellegű megfigyelés pl. AML esetén legkorábban talán Horwitz és munkatársai által került leírásra (Horwitz, et al. 1996). A leggyakoribb előfordulás a szülő- gyermek asszociáció volt. Egy 20 éves periódus (1983-2003) adatait analizálva azt találtuk, hogy a malignus megbetegedés megjelenése a szülőkben az életkor  $68.9 \pm 13.5$  év volt míg a gyermekeikben  $43.7 \pm 18.3$  év. Ez a különbség még akkor is szignifikáns volt ha csak a krónikus eseteket vettük figyelembe ( $66.3 \pm 13.9$  év vs  $47.7 \pm 14.6$  év,  $p < 0.0001$ ). Ez azt eredményezte, hogy a vizsgált esetek túlnyomó részében a gyermekekben hamarabb jelentkezett a malignus megbetegedés, mint a szülőkben. Az életkori eltérésen kívül a malignitás foka is eltért a generációk közt, ugyanis 63% azonos, de 34% magasabb malignitási fokot mutatott, míg mindössze 1 esetben (3%) alakult ki kevésbé malignus betegség a gyermekben. Adataink alapján a rizikóbecslést az alábbiakban adhatjuk meg. Észak-Kelet Magyarországon a krónikus lymphoproliferatív megbetegedések (CLPD) incidenciája 100 000 lakosra vonatkoztatva 12.5, az akut leukémiáé (AL) 3.1, vagyis a 20

éves periódus alatti kumulatív incidencia 0.25% és 0.06%. A vizsgált 23 szülő-gyermek pár esetén az említett periódusban 11 CLPD és 4 AL került diagnosztizálásra a 2269 malignus hematológiai betegségben szenvedő egyén közül. Így a 20 év alatti kumulatív incidencia 11/2269 ami 0.48% illetve 4/2269 ami 0.18%. Vagyis ha a szülőknél malignus hematológiai betegség fordult elő, a gyermekekben a valószínűségi hányados  $0.48/0.25 = 1.9$  CLPD és  $0.18/0.06 = 3.0$  AL esetén. Környezeti expozíciós faktor egyetlen esetben sem volt kimutatható. Fontos megjegyezni, hogy a 35 malignus hematológiai beteg párnál mindössze 2 eset volt (5.7%), ahol a betegség a későbbi generációban fiatalabb életkorban jelentkezett. A fenti adatok alapján elmondhatjuk, hogy a relatíve magasabb rizikó ellenére a hematológiai malignus betegség kialakulása nem valószínű, ha az utód már meghaladta azt az életkort, amikor a betegség a szülőnél jelentkezett.



### **3. A XIII-as faktor expresszió egyéb állapotokban**

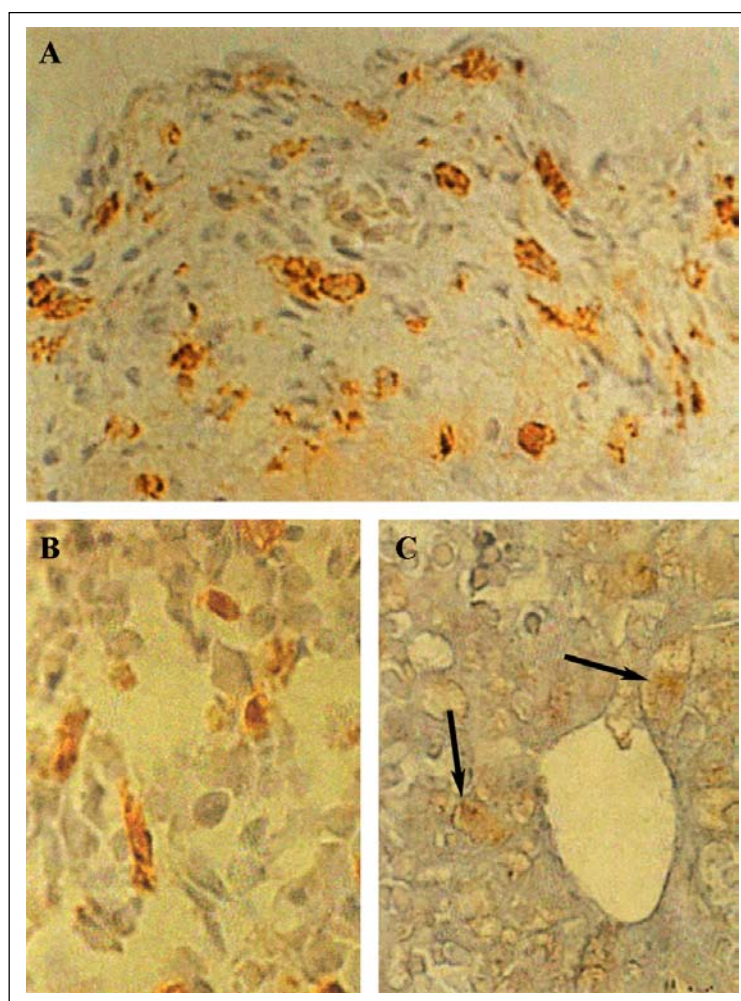
#### ***3.1 A XIII-as faktor expresszió ontogenezis során***

Mint arra az előző fejezetben leírt vizsgálatokban utaltunk, elsőként alkalmaztuk áramlási citometriai vizsgálatokban a XIII-as faktort mint leukémiák vizsgálati markerét. A XIII-as faktor, más néven Laki-Lóránd faktor két kiváló magyar kutató által leírt enzim, melynek celluláris és szöveti lokalizációjában a talán legtöbb felismerés a Debreceni Egyetemen született a nyolcvanas évek második felében (Adany, et al. 1985, Adany, et al. 1988, Adany, et al. 1987, Muszbek, et al. 1988, Muszbek, et al. 1985, Nemes, et al. 1986). Mi a kilencvenes évek elején kezdett vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestünk választ, hogy mikor jelenik meg az emberi egyedfejlődés folyamán a különböző szövetekben a XIII-as faktor A alegysége.

Ezen munka során - melyekhez rendelkezünk a Debreceni Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével - 30 embrionális és magzati mintát használtunk fel melyek legális abortuszokból származtak. A kísérletekben elsődlegesen a magzati hemopoetikus szerveket vizsgáltuk. A gesztációs 5-6. hétből származó szikhólyag mintákban a FXIII-A tartalmú sejteket nagy mennyiségben lehetett kimutatni a mesenchymális területen csillag alakú sejtekben. A májszövetben az 5-16 hetes gesztációs hétből származó mintákat vizsgáltunk. A korai (5-7. hét) mintákban számos FXIII-A tartalmú sejtet lehetett detektálni, de az ilyen sejtek aránya a 13. hétre jelentősen lecsökkent. A FXIII-A kimutatást elvégeztük a Biogenex antigénfeltáró kezelése után is. Még ilyen körülmények között sem tudtunk kimutatni FXIII-A-t a májsejtekben a korai mintákban, csak a 20. gesztációs héten jelent meg alacsony intenzitású jelölődés bizonyos hepatocytákban, elsősorban a centrális vénák körül. (37. ábra). A hosszú csöves csontok és a clavicula esetén metszeteket és csontvelői keneteket vizsgáltunk meg. A FXIII-A

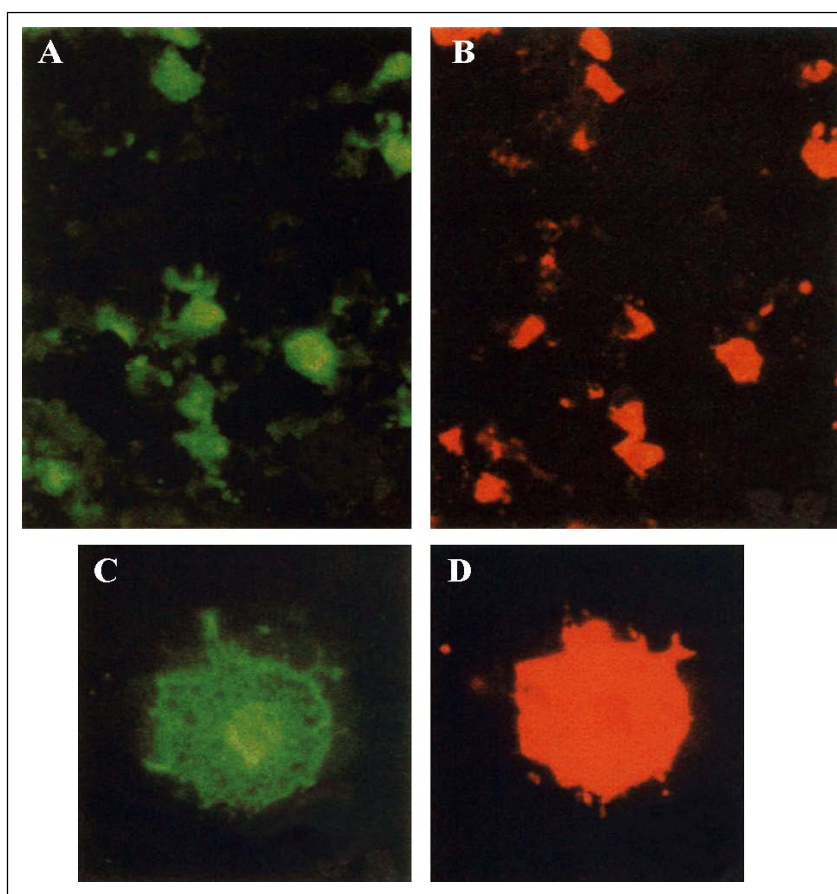
pozitív sejtek megjelenése a 10. héten kezdődött a claviculában, de a 13. hét körül megjelent a hosszú csöves csontokban (humerus, femur) is.

Kettős jelzésű rendszerben jellemeztük a FXIII-A tartalmú sejteket a parenchymás szervekben és a szisztémás keringésben is. Mivel a magzati életben a máj a fő hemopoetikus szerv, számos májmintát vizsgáltunk meg a legkülönbözőbb magzati életkorokból. A FXIII-A és a KiM7 reakció gyakorlatilag ugyanazon sejtpopulációt jelölte, bár elvétve FXIII-A+/KiM7- és FXIII-A-/KiM7+ sejtek kimutathatók voltak, de ezek aránya nem haladta meg a 10%-ot. Az 5-7 gesztációs hétből származó májakban a FXIII-A és az RFD7 75-80%-os átfedést mutatott. A HLA-DR pozitivitás meglehetősen ritka volt a májmintákban és egy teljesen más populációt jelölt mint a FXIII-A.



37. ábra: Az 5. gesztációs héttől a szikhólyag mintákban (A) és a 6. gesztációs héttől a májban (B) kimutatható volt a FXIII-A jelölődés. A májsejtekben csak antigén feltárás után volt észlelhető minimális antigén pozitivitás (C, lásd nyilak).

A fent említettektől eltérően a csontvelőben egy más jelölődési mintázatot találtunk. A FXIII-A pozitív sejtek jelentős hányada RFD7-re nem jelölődött. Ezen sejtek megakaryocyták voltak és GPIb pozitivitást mutattak. A GPIb-/FXIII-A+ sejtek viszont RFD7+ macrophagoknak bizonyultak. Hasonlóan a magzati májmintákhoz a csontvelőben is a HLA-DR és a FXIII-A két eltérő populációt jelölt. A magzati keringésben cytocentrifugált sejteket vizsgáltunk meg. A 7. gesztációs hét körül valamennyi vvt magvas volt. Olykor kimutathatóak voltak FXIII-A+ nagy mononuclearis sejtek, melyek KiM7+/HLA-DR-/RFD7- leukocytáknak bizonyultak. Nagyobb nagyításnál nyilvánvaló volt, hogy - bár ezek a sejtek számos phagocytá vakuólumot tartalmaztak - a FXIII-A egyértelműen intracitoplazmatikus lokalizációban volt kimutatható (38. ábra). A különböző anatómiai helyekről származó minták összefoglalását a következő táblázat tartalmazza (9. táblázat).



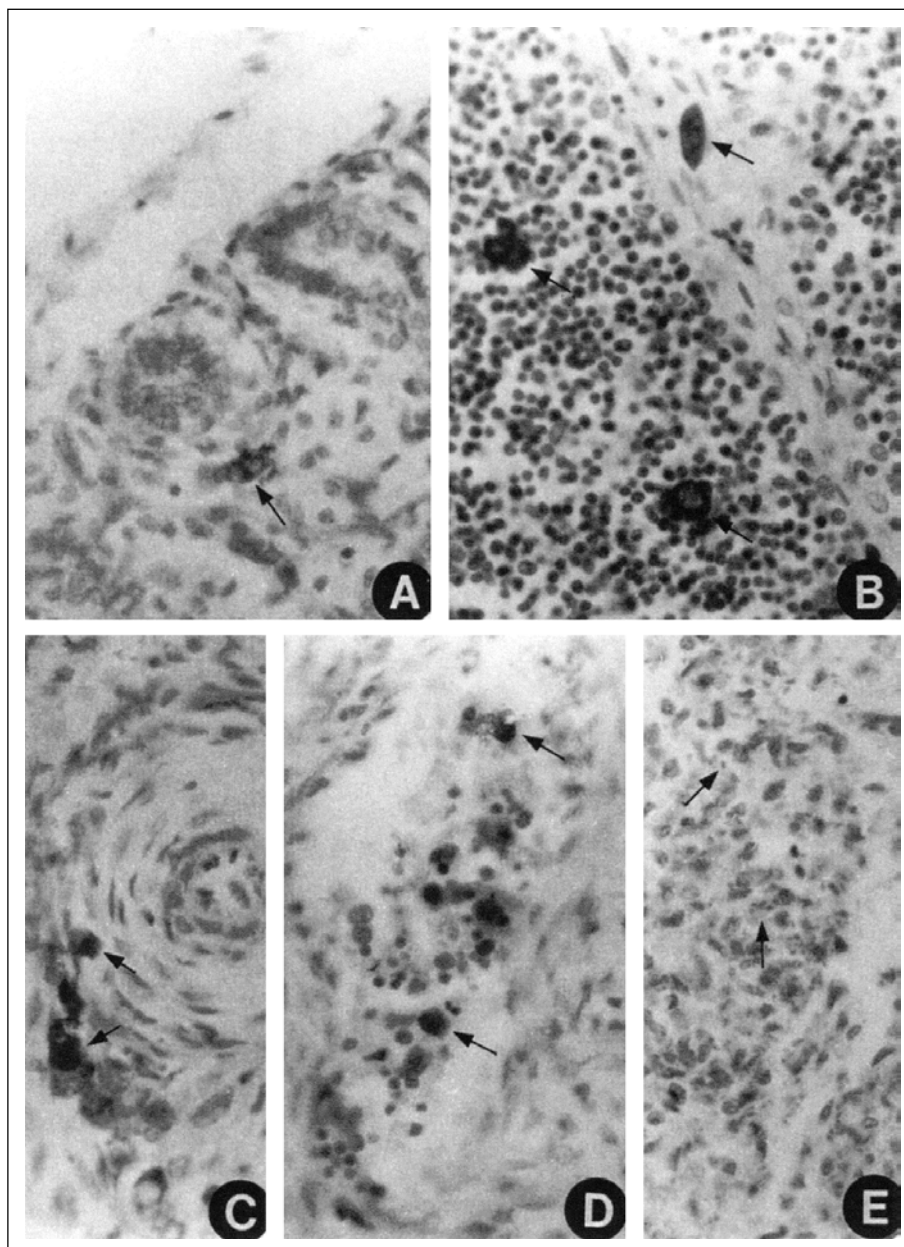
38. ábra: Kettős jelöléssel a 6. gesztációs héten a májban a FXIII-A+ sejtek (A) KiM7+ macrophagoknak bizonyultak (B) csakúgy mint a perifériás vér cytospin mintáin a 7. gesztációs héten (C és D).

Lokalizáció	KIM7	RFD7	GPIb	HLA-DR
Keringő vér (7. hét)	+	-	-	-
Máj (7. hét)	+	+	+	-
Csontvelő (14. hét)	+	+	+	-

9. táblázat: A FXIIIA-pozitív sejtek festődési jellegzetességei különböző anatómiai helyekről.

Az egyéb szervek részletes vizsgálata során azt találtuk, hogy a tüdők esetén a korai minták (6-8. gesztációs hét) nem mutattak pozitivitást, de a 16. héten kerek, FXIII-A+ sejtek jelentek meg a tüdő mesenchymális sejtjeiben az alveolusok környezetében. A thymus minták esetében a 12-16. héten a FXIII-A pozitív sejtek alacsony arányban az interlobuláris kötőszövetben voltak kimutathatók. A lép mintákban a 13-16. gesztációs héten a FXIII-A pozitív sejtek a vörös pulpában jelentek meg. Ezen kívül a lépben a stagnáló véredényekben jelentős mennyiségű FXIII-A+ sejt volt kimutatható FXIII-A+ thrombocytákkal együtt. A szív és a vesemetszetekben nem volt jelen a FXIII-A jelölődés a 16. gesztációs hétig, míg a kötőszövetben FXIII-A+ sejtek mindig kimutathatók voltak a legkülönbözőbb anatómiai lokalizációkban. (39. ábra).

Az emberi egyedfejlődés során a 3. gesztációs hét a feto-placentalis keringés kialakulásával ér véget és megjelennek a hemopoetikus sejtek első generációi. Az embrionális hemopoiesis kialakulásának feltétele az intakt szikhólyag megléte és az őssejtek migrációja a szikhólyag vasculáris rendszeréből. Feltehetően a migráló hemopoetikus sejtek nem csak a másodlagos hemopoetikus szervekben megjelenő vérképzésért felelősek, hanem ezen sejtek egyéb szervekben (pl placenta) való megjelenéséért is. A máj a gesztáció 6. hetétől hemopoetikus szerv. Az itt lévő sejtek vagy a szikhólyagból vándorolnak ide, vagy in situ differenciálódnak primitív mesenchyma sejtekből. A szikhólyagban elvileg kétfajta sejt mutathat FXIII-A pozitivitást: a macrophag és a megakaryocyt.



39. ábra: Immunoperoxidáz módszerrel a 16. gesztációs héten számos anatómiai lokalizációban kimutatható volt a celluláris FXIII-A jelenléte (A: tüdő, B: thymus, C,D,E: lép).

A fejlődő embrióban a XIII-as faktor jelölődés a különböző helyeken a macrophag differenciációs markerekkel mutatott kolokalizációt. Ezek alapján a FXIII-A jelölődést az embrióban macrophagok hordozzák, vagy olyan megakaryocyták melyek nem migrálnak az intraembryonalis szövetekbe mint a macrophagok. A keringő vér sejtjeit vizsgálva a 7. és 9. gesztációs héten a May-Grünwald-Giemsa festett keneteken nem volt megakaryocyta kimutatható és a májban is elsődlegesen a macrophagok hordozták a FXIII-A pozitívást, ugyanis a sejtek 90%-a KiM7-re és FXIII-A-ra egyidejűleg pozitív

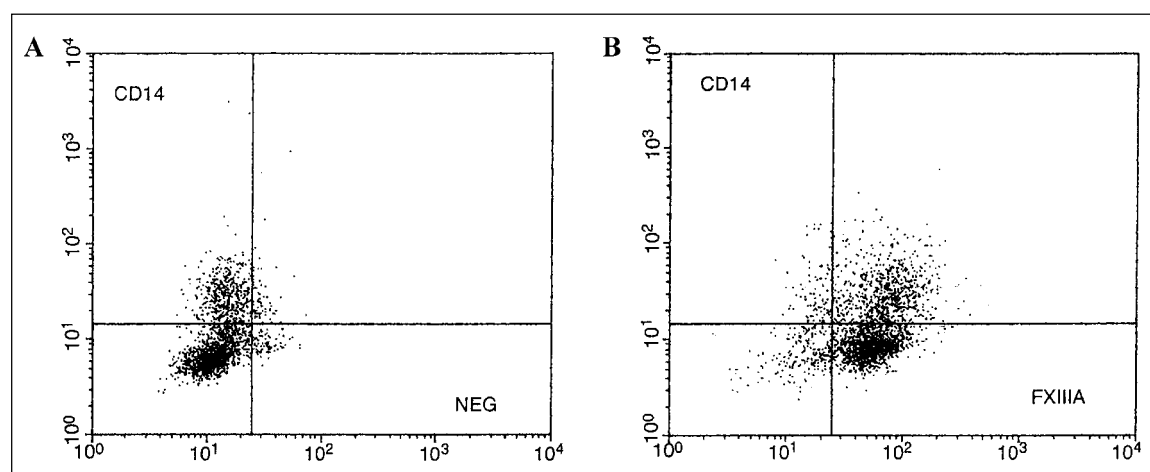
volt. Az ontogenezis során a csontvelőben a FXIII-A pozitivitás a 9. gesztációs héten jelent meg először a claviculában. A 12-14. gesztációs hetekben a májban jelentősen csökkent a FXIII-A+ sejtek aránya a 7. héthez képest és a 19. hétre már alig volt FXIII-A pozitivitás kimutatható. A gesztáció 9. hete után a májban rohamosan csökkent a FXIII-A+ elemek aránya és ezzel egyidejűleg emelkedett a csontvelőben. Ez a jelenség lehet részben a magyarázata az állandó FXIII aktivitásnak a vérben, ugyanis – legtöbb alvadási faktorról ellentétben – a XIII-as faktor aktivitása a 2. trimeszter végétől a szülésig közel normál, a felnőtt szintjének megfelelő.

Megfigyeléseink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a FXIII-A először mesenchymalis sejtekből differenciálódott macrophagokban jelenik meg és csak később a csontvelőben. A második differenciálódott sejtípus mely FXIII-A-t tartalmaz a megakaryocytá. Mindkét sejtípus megelőzi a klasszikus csontvelői eredetű monocytát, mely csak a fejlődés egy későbbi szakában jelenik meg. Az utolsó sejtípus mely FXIII-A expressziót mutat a hepatocytá. Itt a reakció igen gyenge és kizárólag antigén feltárás után volt kimutatható. Ahhoz, hogy a FXIII szisztémás in vivo hatást kifejtsen, vagy szekretálódni kell vagy a sejtfelületen expresszálni. Az előző mechanizmusra egyáltalán nem rendelkezünk adattal, az utóbbira pedig meglehetősen ellentmondásos eredmények vannak, így a celluláris FXIII szerepe ma is vita tárgya.

### ***3.2 XIII-as faktor expresszió macrophagokban***

A különböző alvadási faktorok celluláris expressziójának vizsgálatát normál és patológiás mintákon mikroszkópos technikákkal a 80-as évek végén és a 90-es évek elején részletesen tanulmányoztuk. Akkori eredményeinkben a vérelvadás extrinsic útjának valamennyi faktorát és a XIII-as faktor antigént is ki tudtuk mutatni számos szervben illetve szerózus üregben megjelenő macrophagban (Adany, et al. 1989, Kappelmayer and

Adany 1989, Kappelmayer, et al. 1994, Muszbek 1993). Az elmúlt években a bronchoalveolaris mosófolyadék XIII-as faktor tartalmát vizsgáltuk gyermekpulmonológusokkal történő kollaborációban. A vizsgálatok során arra a következtetésre jutottunk, hogy a bronchoalveoláris mosófolyadékban a korábban ismertetett ELISA technikával kimutatható A<sub>2</sub> alegység, melynek egyetlen forrása a bronchoalveoláris macrophag. Ezekben a sejtekben - hasonlóan az AML M4 és M5 blastokhoz - a FXIII-A specifikusabb marker mint a CD14 (40. ábra). A bronchoalveoláris térben lévő FXIII-A a fibrin és a fibrinolízis inhibitorok keresztkötésével az extravascularis fibrin turnoverk egy fontos regulátora lehet.



40. ábra: FXIII-A kimutatása a bronchoalveoláris macrophagokban. A PE-konjugált CD14 és izotípus kontroll (A) illetve a CD14 és a FITC konjugált FXIII-A jelölődés (B) képe.

#### 4. Celluláris prothrombotikus mechanizmusok

Ebben az alfejezetben az alábbi eredmények kerülnek bemutatásra és megbeszélésre:

- két alvadásaktivációval járó betegségben (ischemiás stroke és diabetes mellitus) végzett vizsgálatok
- humán mintákon végzett in vitro thrombocytá aktiváció kapcsán kapott eredmények
- egérkísérletekben kiváltott thrombosis modellben kapott eredmények.

##### 4.1 *Thrombocytá aktiváció in vitro és in vivo vizsgálata*

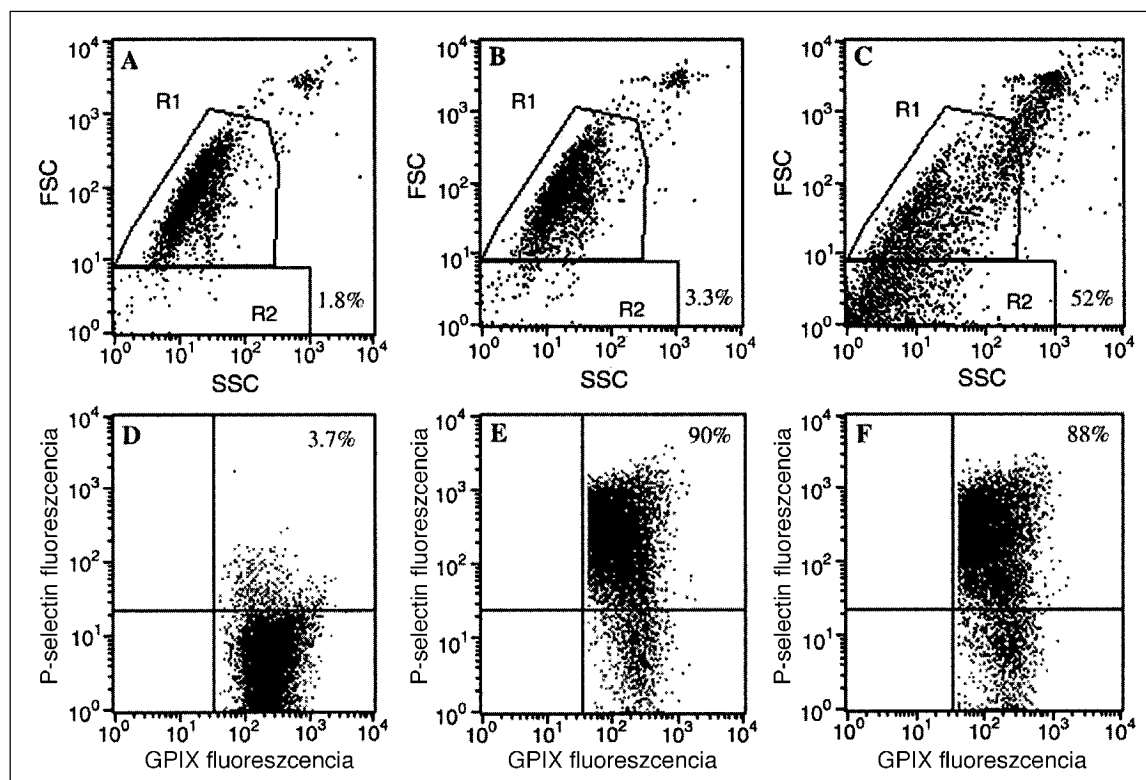
###### 4.2.1 *Thrombocytá receptorok mennyiségi változása aktiváció során*

A thrombocytá aktiváció során gyors változások játszódnak le a thrombocytá felszínén, melyek közül kiemelkedő jelentősége van az alfa granulumok kiürülése során a a thrombocytá felszínére kerülő P-selectin kimutatásának. A nem aktivált thrombocytá gyakorlatilag nem mutat P-selectin expressziót, kontroll egyéneken a thrombocyták 1-2%-a mutat P-selectin pozitivitást. Különböző kórképekből származó ex vivo minták esetén a P-selectin expresszió mértéke - a mintakezelési módszertől függően - 6-8%-os értéket is elérhet. Az in vitro thrombinnal vagy TRAP-al maximálisan aktivált minták esetén 85-90%-os expresszió jön létre és az aktiváció néhány percen belül megtörténik. A a thrombocytá aktiváló szer koncentrációjának emelésével a P-selectin expresszió kívül egyéb változások is észlelhetők.

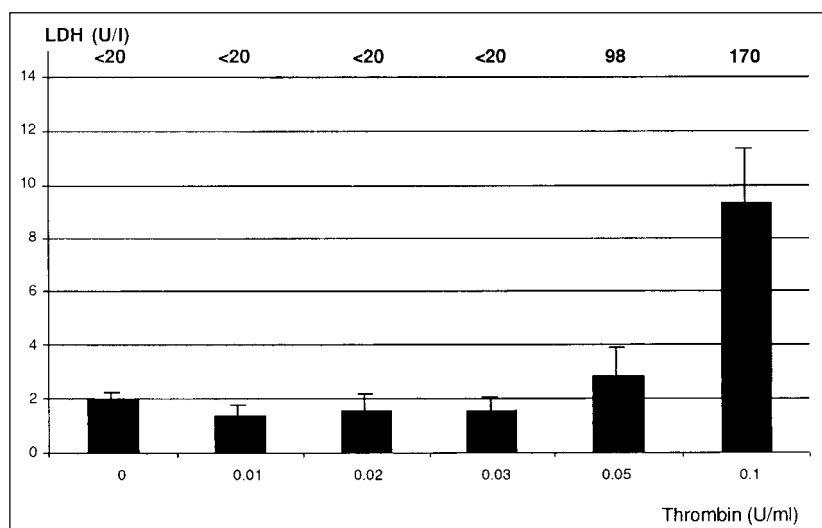
Alacsonyabb thrombin koncentráció esetén (0.05 U/ml) a P-selectin expresszió már 90% körül volt de a thrombocyták felhőképén minimális eltérés volt észlelhető a nem aktivált mintához képest. A sejtek nagy része ugyanúgy a normál thrombocytá kapuban helyezkedett el és csak minimálisan emelkedett a mikropartikulák aránya az R2 régióban. Extrém nagy thrombin koncentráció esetén (0.5 U/ml) a P-selectin expresszió nem



változott, de a mikropartikulák aránya jelentősen emelkedett (41. ábra). Az olyan mértékű aktiváció mely a thrombocyta populáció nagy részének mikropartikulákká történő szétesését eredményezte, komoly sejtlízissel járt amit az LDH aktivitás emelkedésével követtünk (42. ábra).

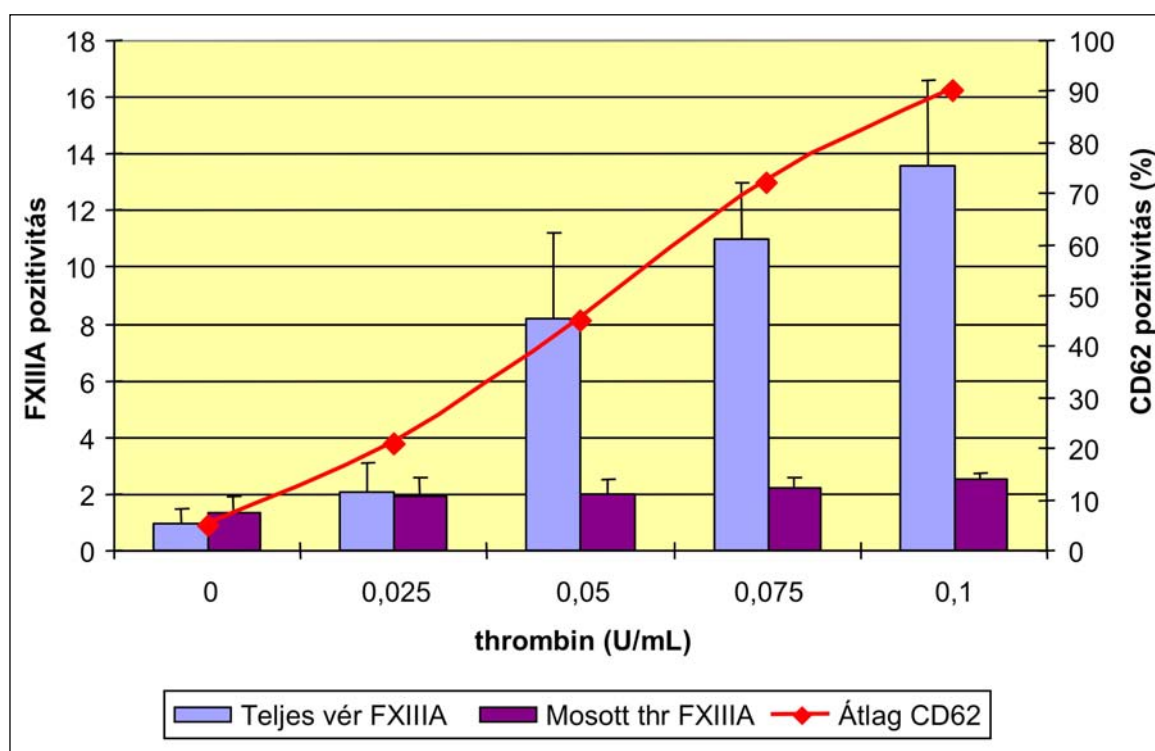


41. ábra: Fényszórási kép és P-selectin expresszió nyugvó és thrombin aktivált thrombocytaikon. A vérlemezskéket anti-GPIX-el és anti-P-selectin-nel jelöltük. A nem aktivált vérlemezkéek (A,D) esetén minimális a P-selectin expresszió. Alacsony thrombin koncentráció (0.05 U/ml) már maximális P-selectin expressziót hoz létre (B,E) de nem okoz jelentős mikropartikula képződést, míg magas, 0.5 U/ml-es thrombin koncentrációnál (C és F) a mikropartikula képződés is jelentős.



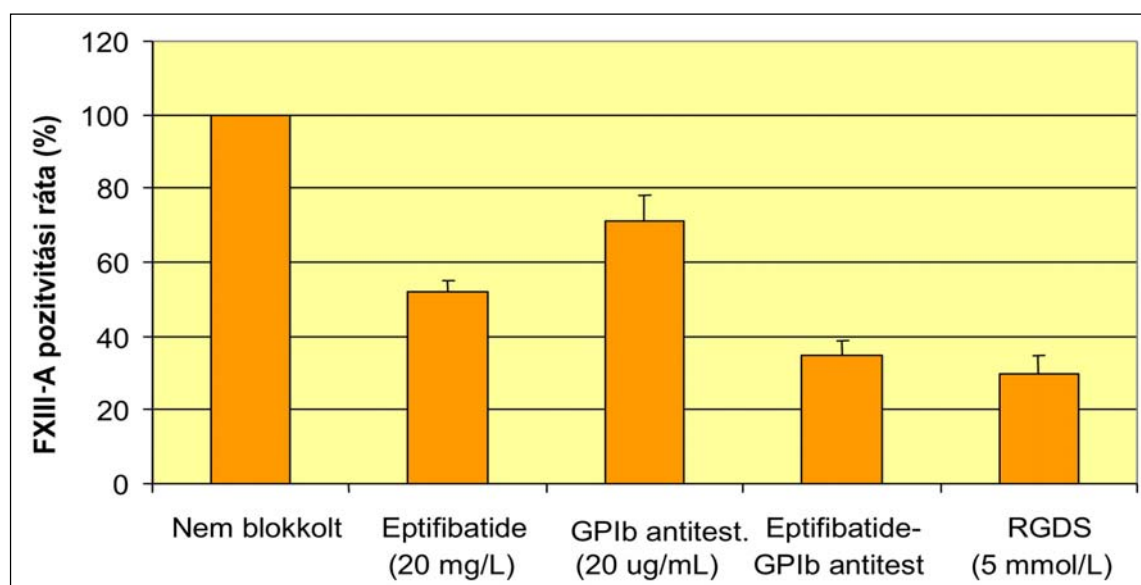
42. ábra: A thrombin koncentráció emelésével nő a mikropartikulák aránya és ezzel együtt az LDH aktivitása is amely sejtlízisre utal.

A thrombocyták és a plazmából izolált mikropartikulák P-selectin expressziója jelentősen eltért. Kontroll egyén aktiválatlan thrombocytáinak P-selectin expressziója 2% volt, míg ugyanezen egyén plazmájából izolált mikropartikulák P-selectin expressziója 50%-os értéket adott, ami arra utal, hogy a mikropartikula egy „szelektív shedding” következtében kerül a plazmába. A thrombocyták igen jelentős mennyiségben tartalmaznak XIII-as faktort mely a thrombocyta citoplazmájában található. A thrombocyták (és természetesen a megakaryocyták is) a XIII-as faktornak kizárólag az „A” alegységét tartalmazzák, de ebből igen nagy mennyiséget. Az aktiválatlan thrombocyták felszínén nem mutatható ki FXIII-A. Hígított teljes vérben történő thrombin aktiváció során viszont a thrombocyta felszínén megjelenik a FXIII-A, de FXIII-B nem mutatható ki. Hasonló vizsgálatot végezve mosott thrombocytákon, nem találtunk FXIII-A emelkedést, noha a thrombocyta aktivációt jelző P-selectin expresszió egyértelműen kimutatható volt (43. ábra).



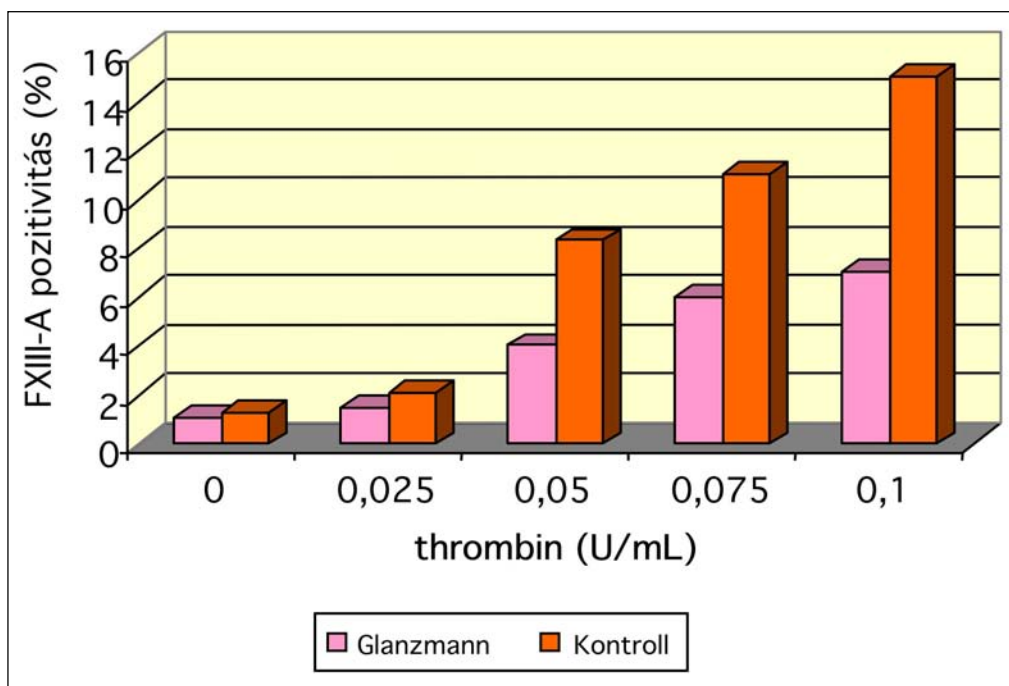
43. ábra: Teljes vérben a növekvő thrombin koncentrációval emelkedik a P-selectin expresszió és ezzel párhuzamosan a FXIII-A jelölődés, de mosott thrombocytákon csak a P-selectin pozitivitás mutatható ki a FXIII-A jelölődés nem.

Ez arra utal, hogy a FXIII-A valószínűleg a plazmából kötődik a thrombocyta felszínére és nem a thrombocytából szekretálódik. Annak vizsgálatára, hogy a thrombocyta felszínén mihez kötődhet a FXIII-A, aktivált thrombocytákat két GPIIb/IIIa gátló anyaggal (RGDS és Integrilin) előinkubáltuk majd vizsgáltuk a FXIII-A expressziót. Mindkét esetben azt találtuk, hogy a GPIIb/IIIa blokkoló szerek 50%-al csökkentették a FXIII-A expressziót mely hatás dóziszfüggő volt de a GPIb elleni antitest előinkubáció is 1/3-al csökkentette a FXIII-A kötődést. (44. ábra). Súlyos Glanzmann thrombastheniás beteg thrombocytáinak vizsgálatakor 50%-kal csökkent expressziót találtunk (45. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a FXIII-A kötődésért a GPIIb/IIIa jelentős részben felelős, de nem kizárólagos receptora a FXIII-A-nak.



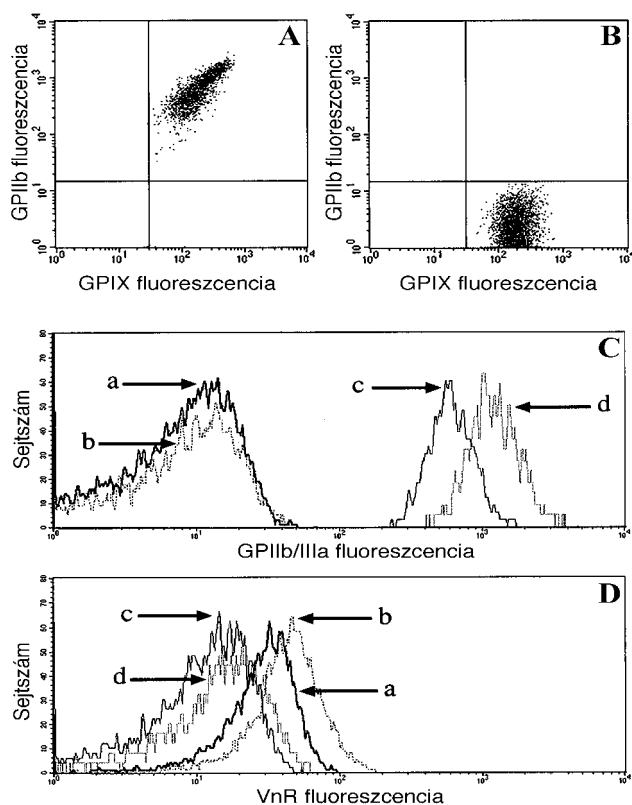
44. ábra: Teljes vérben a thrombocyta felszíni FXIII-A kötődés gátolható. A legkifejezettebb gátló hatást a GPIIb/IIIa gátlószereivel lehetett elérni, de kismértékű gátlást a GPIb elleni antitest is eredményezett.

A Glanzmann-thrombastheniás minta egy olyan betegből származott, akinek sem a thrombocytáinak felszínén sem Triton X100-al történt permeabilizálás után nem volt kimutatható fibrinogén receptor. Kvantitatív áramlási citometriával meghatározva ez az érték <50 receptor sejtnek adódott. Ha a vérlemezkéket TRAP-al aktiváltuk, akkor a kontroll thrombocytákon a GPIIb/IIIa szint emelkedését észleltük, míg a beteg thrombocytákon semmilyen változást nem észleltünk.



45. ábra: Glanzmann-thrombastheniás beteg vérlemezkéin a thrombinnal történő aktiváció után csak a kontroll FXIII-A jelölődés felét látjuk.

Mivel a GPIIIa tagja a fibrinogén receptornak és a vitronektin receptornak (VnR) is, kvantitatív áramlási citometriát alkalmazva megvizsgáltuk, hogy a TRAP aktiváció hatására, hogyan alakul a VnR szint kontroll és Glanzmannos-beteg trombocytaín.



46. ábra:

A trombocyta felszíni receptorok analízise. A kontroll trombocyta mind a GPIX mind a GPIIb jelölődésre pozitív volt (A), míg a Glanzmann-thrombastheniás beteg a GPIIb-re teljesen negatívnak adódott (B). Az alsó ábrákon indirekt jelöléssel vizsgáltuk a GPIIb/IIIa komplexet (C) és a vitronektin receptort (D) TRAP aktiváció után. (a: beteg TRAP nélkül, b: beteg TRAP aktiváció után, c: kontroll TRAP nélkül, d: kontroll TRAP aktiváció után).

Ellentétben a GPIIb/IIIa-val a VnR kimutatható volt a beteg vérlemezkéin (377/thrombocyta) és szintje szignifikánsan magasabb volt mint a kontroll thrombocytaikon mért érték ( $97 \pm 36$ /thrombocyta). A thrombastheniás beteg mintájának aktivációja szignifikáns emelkedést eredményezett a thrombocyták VnR szintjében (634/thrombocyta) míg a kontroll VnR szintje nem változott (46. ábra). Ez arra utal, hogy egyrészt a GPIIb hiányában a GPIIIa kialakítja a VnR-t az  $\alpha_v$  integrinnel közösen, másrészt szintje jóval magasabb mint normál esetben, amikor az alfa granulumok membránjában dominál a GPIIb/IIIa komplex.

## **4.2 *Alvadásaktivációval járó kórképek vizsgálta***

### **4.2.1 *Szöveti faktor expresszió stroke-ban***

Az artériás thrombosisok ethiopathogenesisében a thrombocyta aktivációt igen jelentősnek tartják. Negyvennyolc, 50 év alatti stroke-os betegben (23 férfi és 25 nő) végeztük a vizsgálatokat és a vérzést CT, MRI és agyi angiographiás vizsgálat segítségével zártuk ki. Ha a vérminta vétele a tüneteket követő 48 órán belül történt, akkor akut, ha ezen időn túl, akkor krónikus stroke-nak tartottuk az állapotot. Az eredményeket az akut és a krónikus esetekre külön-külön adtuk meg és a kontroll csoporthoz viszonyítottuk. A szöveti faktor expressziót áramlási citometriával az Anyag és Módszer fejezetben ismertetett indirekt immunfluoreszcens eljárással végeztük. A százalékos pozitivitás mellett az átlagos fluoreszcencia intenzitásokat is megadtuk. A szöveti faktor expresszió a monocyták felszínén mind akut mind krónikus szakban magasabb volt mint kontrollokban ( $p < 0.05$ ). Annak eldöntésére, hogy az emelkedett szöveti faktor expresszió korábbi gyulladás következménye lenne, C-reaktív protein (CRP) vizsgálatokat végeztük és azt találtuk, hogy a betegek 76%-nak a CRP értéke 10 mg/L alatt volt és a maradék 24%-ban sem volt jelentős CRP emelkedés. A

mononukleáris sejteket lizáltuk és egyfázisú alvadási assay-vel prokoaguláns aktivitást (PCA) határoztunk meg. A mononukleáris sejtek lizátumának PCA-ja mindkét betegcsoportban emelkedett volt a kontrollokhoz képest, de csak az akut stroke-os betegek esetén ért el szignifikáns emelkedést ( $p < 0.05$ ). (10. táblázat).

	kontroll	Agyi ischemia	
		akut	krónikus
szöveti faktor antigén, %	3.2±0.7	10.7±1.8**	9.1±1.7*
szöveti faktor aktivitás, mU	109±25	220±29*	193±31
Betegek száma	40	25	23
A feltüntetett értékek átlag± SEM. ** $p < 0.01$ , * $p < 0.05$ A szöveti faktor aktivitás mU/10 <sup>6</sup> monocytára van megadva.			

10. táblázat: Monocyta szöveti faktor antigén és aktivitás a betegekben és kontrollokban.

Az agyi ischemia vagy thromboticus/emboliás vagy hemodinamikai jelenség. Mind akut, mind krónikus fázisban szignifikánsan emelkedett TAT és protrombináz fragment (F<sub>1+2</sub>) értékeket találtunk és a TAT értékek korreláltak a szöveti faktor expresszió fokával ( $r = 0.725$ ). A fibrinolitikus rendszer aktivációját a D-dimer értékekkel követtük és azt találtuk, hogy az akut fázisban nem különbözött a kontroll értékektől, de a krónikus fázisban szignifikánsan magasabb volt ( $p < 0.05$ ), bár az emelkedés mértéke nem érte el a TAT és F<sub>1+2</sub> emelkedés mértékét (11. táblázat).

Vizsgálati csoportok	TAT (ng/ml)	F <sub>1+2</sub> (nmol/l)	D-dimer (ng/ml)
Akut ischemia (n=25)	23.9±8.3***	5.53±1.24***	301±59
Krónikus ischemia (n=23)	30.7±9.6**	3.18±0.64**	488±80*
Kontroll ischemia (n=40)	3.1±0.27	1.41±0.20	254±33
F <sub>1+2</sub> a prothrombin fragmentumokat jelöli. Az átlag±SEM került feltüntetésre. *** $p < 0.005$ , ** $p < 0.01$ , * $p < 0.05$			

11. táblázat: Betegek és kontrollok F<sub>1+2</sub> TAT és D-dimer értékei.

A vizsgálatok arra is fényt derítettek, hogy a kontroll monocyták sem teljesen negatívak a szöveti faktor expresszióra. Ennek vagy az izolálási folyamat enyhe aktiváló hatása az oka vagy a kontrollokban is jelen lehet olyan egyéb állapot, mely enyhe fokú monocyta szöveti faktor expressziót indukál. A legvalószínűbb az, hogy a szöveti faktor expresszió a stroke-os betegek monocytáin az ischemiás inzultus következménye és így súlyosbító tényező ebben a kórképben. Nehéz megmondani, hogy mi indukálja a monocytákat szöveti faktor termelésére. Korábbi vizsgálatok azt találták, hogy az endotoxin (Niemetz 1972), C5a (Muhlfelder, et al. 1979), immunkomplexek (Schwartz and Edgington 1981) és plazma lipoproteinek (Levy, et al. 1981) indukálhatnak monocyta szöveti faktor szintézist és újabban ilyen hatását mutatták ki a CRP-nek is (Cermak, et al. 1993). Mivel megelőző szubklinikai fertőzés lehet oka az agyi ischemiának és a CRP indukálhatja szöveti faktor expressziót, mi megvizsgáltuk a betegek CRP szintjét és azt találtuk, hogy az esetek zömében az 10 mg/l alatt volt. A fentiek alapján úgy gondoljuk, hogy a CRP agyi ischemiában valószínűleg nem olyan szenzitív marker mint myocardialis ischemiában és feltehetően nem játszik döntő szerepet a szöveti faktor expresszió létrejöttében.

Az agyi ischemia jelentős thrombin képződést eredményez. Ennek következtében mind a TAT, mind a prothrombináz fragment értékek jelentősen emelkedettek voltak. Az emelkedés mértéke az első 72 órában volt a legkifejezettebb. Ezzel ellentétben a D-dimer szint ebben a periódusban normális volt. Ez a megfigyelés összhangban van azzal a ténnyel, hogy az  $F_{1+2}$  komplex szintje a prothrombináz hatását tükrözi, a TAT a fokozott thrombin hatásra utal mely mindkettő jellemzője a friss thrombusnak, míg a D-dimer a fibrinolitikus rendszer szekunder aktivációjának a következménye (Misz M, 1998, Oláh L, 2001).

#### 4.2.2 Akutfázis markerek stroke-ban

Mivel a 90-es években megjelent közlések jelentősen finomították a CRP hatását a thromo- és atherogenesisben és a CRP referencia tartományának felső határává is az 5 mg/l-es érték vált a 10 mg/l helyett, mi egy későbbi tanulmányban részletesen megvizsgáltuk - többek között - gyulladásos markerek szintjét olyan 55 év alatti betegekben akiknél ultrahanggal kimutathatóan legalább 30%-os szűkület volt detektálható a carotisokon.

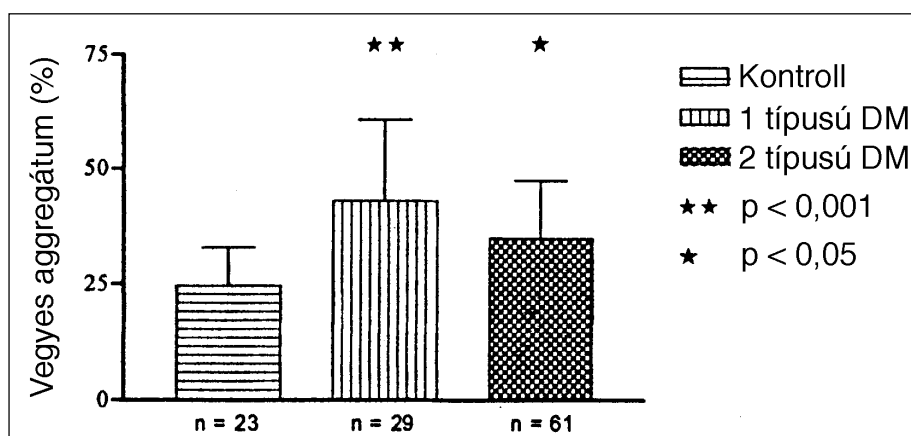
A korábbi eredményekhez hasonlóan itt is azt kaptuk, hogy a CRP értékek nagy része a referencia tartományon belül van. Azonban szignifikánsan magasabb ( $p=0.0012$ ) szintek voltak mérhetők a stenosis (7.3±6.4 mg/l) illetve teljes occlusioval (10.1±17.1 mg/l) rendelkező csoportokban a kontrollhoz képest (3.7±2.1 mg/l). Ehhez hasonló eltérés volt kimutatható a fehérvérsejt számban és a fibrinogén szintekben is, ami arra utal, hogy a gyulladásos markereknek azért szerepe lehet az agyi atheroscleroticus folyamatok kialakításában.

#### 4.2.3 Thrombocytá aktiváció diabetesben

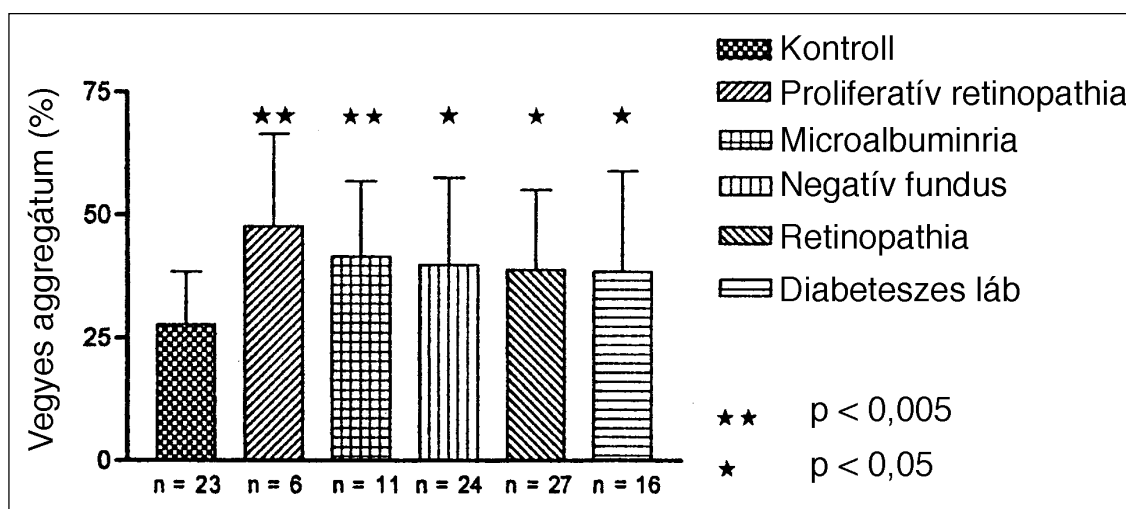
Az indirekt thrombocytá aktivációs markerek sorában kiemelkedően szenzitív vizsgálatnak tartják a thrombocytá-monocytá illetve a thrombocytá-granulocytá vegyes (ún. heterotipikus) aggregátumok létrejöttét. Ezen vegyes aggregátumokat vizsgáltuk diabetes mellitus-ban, ahol a thrombocytá aktiváció, illetve az érszövődmények igen gyakoriak. A vegyes aggregátumok arányának vizsgálata áramlási citometriával történt. A leukocytá felhőképen a FSC-SSC illetve a CD14-SSC dot-plot képek alapján kiválasztott leukocytá subseteken vizsgáltuk meg a GPIIb/IIIa-et jelölő thrombocytá marker (CD42a) arányát. Az eredmények alapján szignifikáns emelkedést találtunk a monocytá-thrombocytá vegyes aggregátumok arányában a kontrollhoz képest mind 1-es mind 2-es típusú diabeteses mellitusban (47. ábra), de a granulocytá-thrombocytá és a lymphocytá-thrombocytá



vegyes aggregátumok mennyisége csak minimálisan volt emelkedett a diabeteses csoporton belül. A monocyta-thrombocyta és a granulocyta-thrombocyta aggregátumok aránya közt korreláció volt kimutatható. A legnagyobb arányú monocyta-thrombocyta vegyes aggregátum a proliferatív retinopathia és a nephropathia csoportban alakult ki (48. ábra).

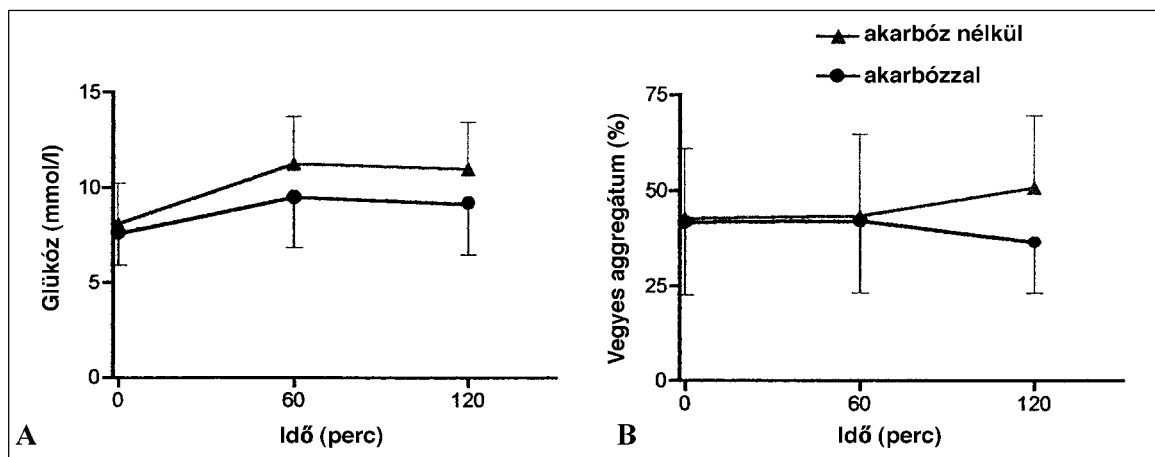


47. ábra: Monocyta-thrombocyta vegyesaggregátumok diabetesben és kontrollcsoportban



48. ábra: Monocyta-thrombocyta vegyesaggregátumok diabeteszes angiopathia különböző csoportjaiban

A HbA1c értékével viszont nem mutatott összefüggést a vegyes aggregátumok aránya. A 2-es típusú diabetesben a postprandialis szérum glükóz és a vegyes aggregátumok száma közt összefüggés volt kimutatható de ez nem érte el a szignifikáns mértéket, azonban egy, a glükóz felszívódását gátló gyógyszer - az acarbose - 120 perc után mind a vércukrot mind a vegyes aggregátum arányt csökkentette (49. ábra).

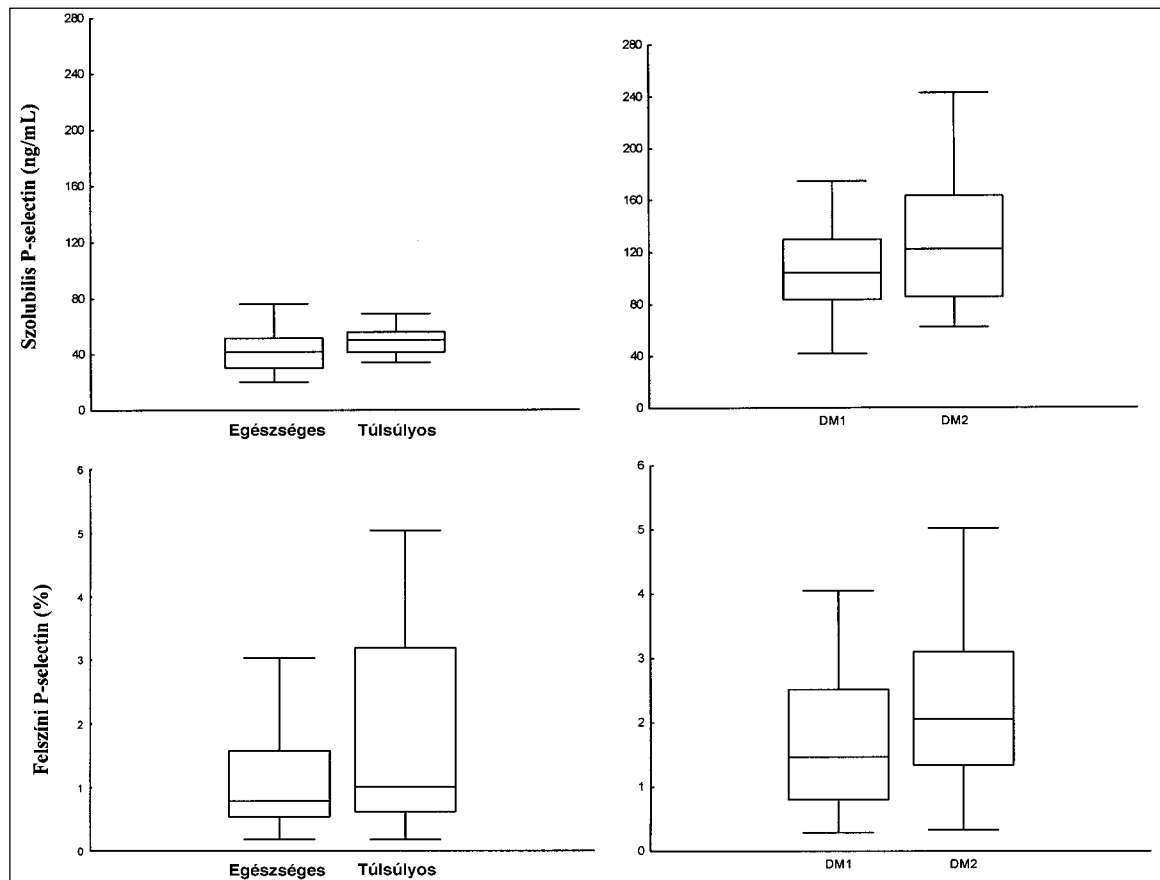


49. ábra: Acarbose hatása a postprandialis glükóz szintekre és a vegyesaggregátumok mennyiségére.

A diabeteses angiopathia kialakulásának pathomechanismusa multifaktoriális jellegű. Az utóbbi években a heterotipikus aggregátumok szerepe is felértékelődött. A vizsgálataink során a GPIX kimutatásával vagy intakt vérlemezkéket vagy mikropartikulákat detektálunk. Mivel ismert, hogy a thrombocyta-leukocyta “cross-talk” révén ezen sejtek egymást aktiválhatják, nem meglepő, hogy a legmagasabb heterotipikus aggregátum szinteket a microvasculáris komplikációval rendelkező csoportokban találtuk. Bár a granulocyta és monocyta receptorok jelentős átfedést mutatnak mi - hasonlóan egy korábbi in vitro vizsgálat eredményeihez (Rinder, et al. 1991) - nem találtunk szignifikáns emelkedést a granulocyta-thrombocyta komplexek szintjében. Az a tény, hogy a postprandialis glükóz emelkedés is emeli a heterotipikus aggregátumok szintjét, fontos lehet, mivel kimutatták, hogy az enyhe postprandialis hyperglycemia is hozzájárulhat a vasculáris szövődményekhez (Ceriello 2000).

A direkt thrombocyta aktivációs markerek közül egy közelmúltban végzett vizsgálat sorozatban meghatároztuk a thrombocyta és a szolubilis P-selectin szinteket egészséges normál testtömegű, túlsúlyos és 1-es valamint 2-es típusú diabeteses betegekben. A BMI és kor szerint illesztett kontrollcsoportra azért volt szükség mivel a 2-es típusú diabeteses betegeknek a BMI-je és életkora jóval magasabb volt mint az 1-es típusú diabetes kontrollcsoportjának. Vizsgálataink során a direkt thrombocyta aktivációs tesztekben is

szignifikáns emelkedést találtunk mindkét betegcsoportban és már túlsúlyos kontrollok esetén is tapasztalható volt emelkedés mindkét vizsgált paraméterben. (50. ábra)

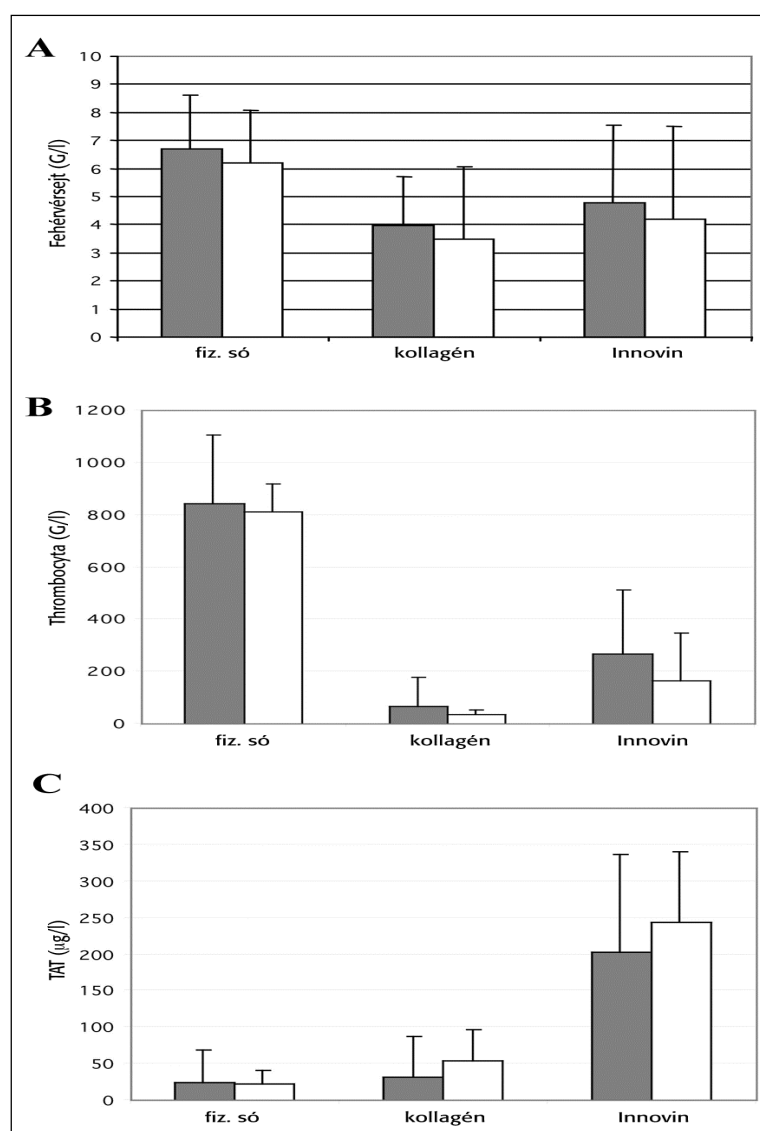


50. ábra: A szolubilis (A) és thrombocita (B) P-selectin szintek diabetesben és a kontrolles csoportokban. A boxok az interkvartilis tartományt, míg az “antennák” az 5 és 95 percentiles értékeket mutatják. (DM1: 1-es típusú diabetes, DM2: 2-es típusú diabetes)

#### 4.2.2. Thrombus kialakulásának vizsgálata P-selectin ligand hiányában

A thrombosis kialakulása során thrombocyták, fehérvérsejtek és az endothelium között számos sejtes interakció jön létre. A thrombocyta-leukocyta illetve az endothel-leukocyta interakciók között kiemelkedő jelentőségű a selectinek (P és E) valamint a leukocyták felszínén konstitutíven expresszáldó selectin ligand (PSGL-1) közt létrejövő kapcsolat. A P-selectin-PSGL1 kötés szerepet játszik a leukocyták endothelen történő lefékeződésben, de feltételezhető, hogy a thrombosis folyamatában szintén szerepe van. Mi, állatkísérletes modellben megvizsgáltuk, hogy a thrombus kialakulása során milyen eltérés tapasztalható PSGL-1 hiányában. A kísérletekhez PSGL-1 knockout egereket és

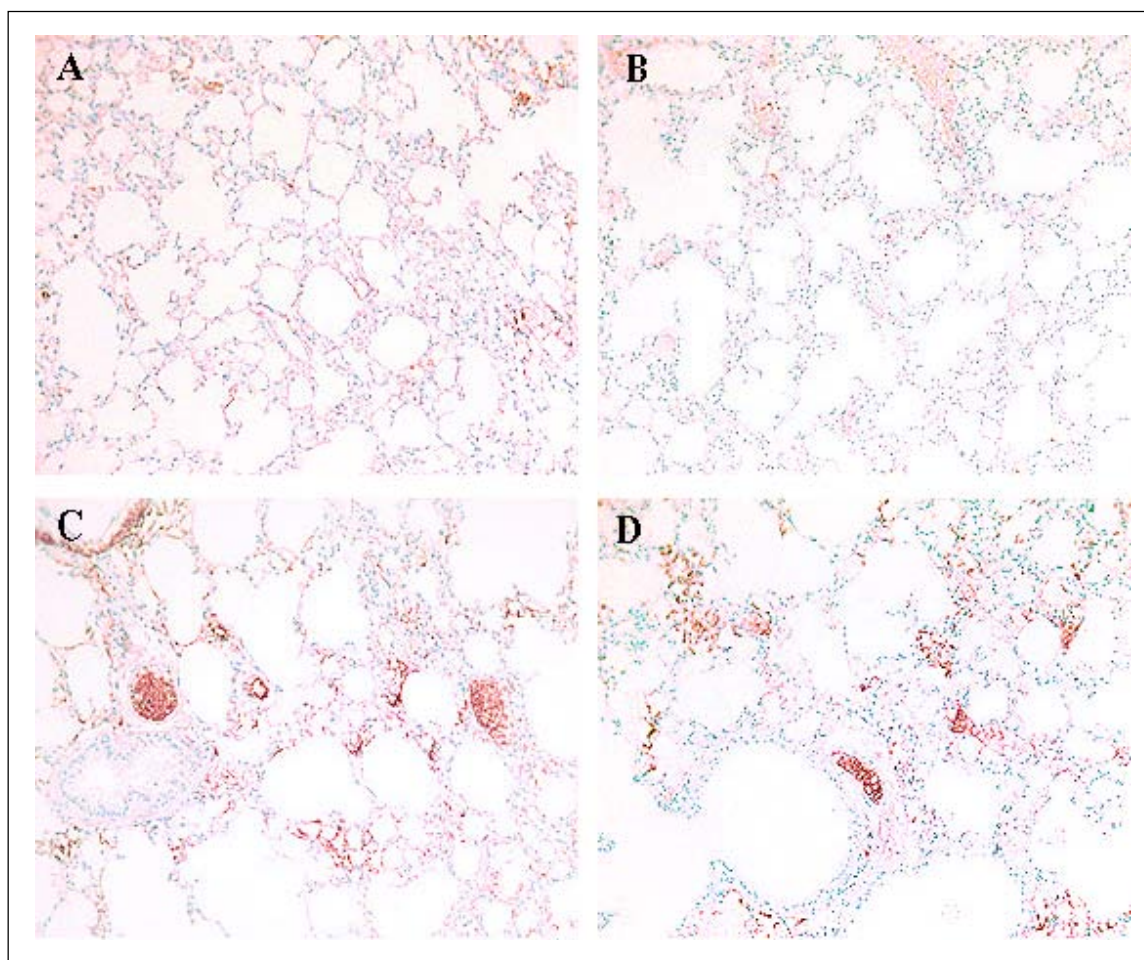
vad típusú egereket használtunk. A thrombosist két módon váltottuk ki, egyrészt 5x hígítású thromboplastinnal (Innovin, Dade) az alvadási kaszkádot aktiváltuk, míg az állatok egy másik csoportjában kollagén és adrenalin kombinált adásával a vérlemezkék aktivációját idéztük elő. A fehérvérsejtszám a kollagén és adrenalin együttes beadása után nagyobb mértékben csökkent mint az Innovin hatására (a kontrollhoz egerekhez képest, melyekbe csak fiziológias sóoldatot fecskendeztünk be). A thrombocyták számában a kollagén és adrenalin sokkal kifejezettebb csökkenést okozott mint az Innovin. Viszont az Innovin hatására lényegesen több trombin-antitrombin komplex generálódott, mint amikor kollagént és adrenalint juttattunk be az egerekbe. A két egértörzs értékei között azonban nem volt szignifikáns különbség (51. ábra).



51. ábra:

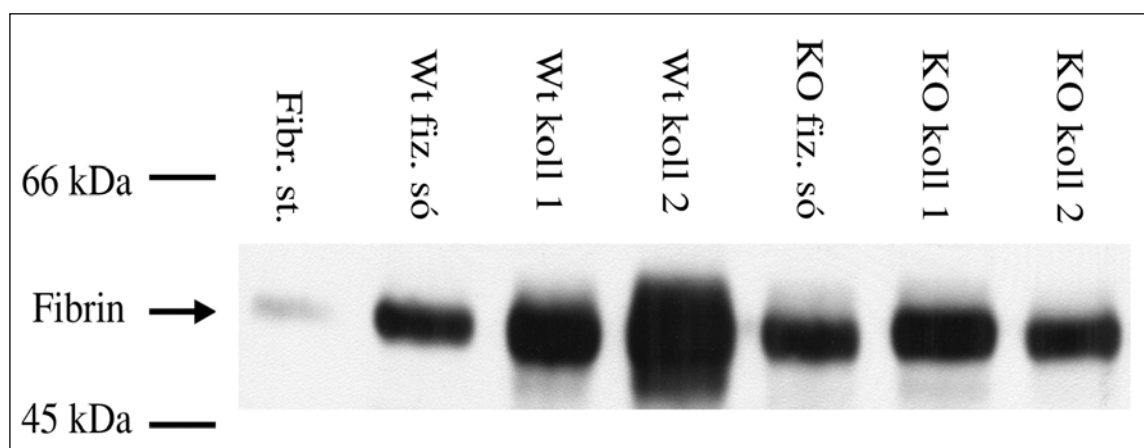
A fehérvérsejt (A) és thrombocyta (B) szám csökkenés kollagén hatására kifejezettebb, míg az Innovin a TAT komplex (C) mennyiségében okoz nagyobb emelkedést (sötét oszlop: vad típus, világos oszlop: PSGL-1 -/-).

A thromboplasztinnal kiváltott alvadásaktiváció után a thrombocytopenia és leukopenia mértéke jóval kisebb volt, viszont jelentős thrombin aktivitás generálódott melyet a thrombin-antithrombin (TAT) komplex szint változásával követni tudtunk. A két genotípus között nem volt eltérés. Valamennyi kísérletben az állatokat a 30. percben cervikális diszlokációval elpusztítottuk és megvizsgáltuk a tüdőben, a májban, a vesében, a szívben és a lépben a fibrin depozícióját egy poliklonális és egy monoklonális antitest segítségével indirekt jelölésű immunhisztokémiai reakciókban. Jelentős különbség mutatkozott a két genotípus között a thrombusok számában illetve a thrombotikus folyamat kiterjedtségében. Minden esetben a szövettani vizsgálatok során a PSGL-1 knockout egerekben kevesebb fibrindepozíció volt kimutatható mint a vad típusú egerekben (52. ábra).



52. ábra: Fibrin depozitumok analízise En-vision detektáló rendszerrel fixált tüdőszöveten, fiz só (A és B) és kollagén-adrenalin beadása után (C és D). A vad típusú egéren nagyobb mértékű fibrin depozíció volt észlelhető (C) mint a PSGL-1<sup>-/-</sup> egéren (D).

A morfológiai adatokat Western-blot vizsgálattal is igazolni tudtuk. Az egerek tüdejéből extrahált fibrin mennyiségének kimutatása során jól látható, hogy a vad típusú egerekben a fiziológias sós kontrollhoz képest jelentősen növekedett a fibrin mennyisége a kollagén-adrenalin expozíció után, míg PSGL1 knockout egerekben nem változott a tüdőben kimutatható fibrin mennyisége (53. ábra).



53. ábra: A tüdőből extrahált fibrin mennyiségének szemikvantitatív analízise Western-blottal. A kollagén-adrenalin beadása után a vad típusú egerekben jelentősen növekedett az extrahálható fibrin mennyisége, míg a PSGL-1  $-/-$  egerekben gyakorlatilag nem változott.

Az a tény, hogy a thromboplasztin aktiváció azonos mértékű thrombin generációt eredményez vad típusú és knockout egerekben nem meglepő, mivel a fluid fázis aktiválhatóságát a selectin ligand hiánya nem befolyásolja. Kollagén-adrenalin stimuláció nyomán kialakult thrombocyták és a leukocyták számának csökkenése a létrejött disszeminált thrombosis miatti consumptio következménye. Ezek igen durva becslői a thrombotikus folyamatnak, melyek értékében megint csak nem volt különbség a 2 genotípus között. A tüdőben kialakult thrombusok száma, illetve a tüdőből extrahált fibrin Western blotting-al történő szemikvantitatív analízise viszont egybehangzóan arra utal, hogy a PSGL-1 hiánya valamelyes protektív szereppel bír az intravasculáris thrombusképződés során.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A hematológiai megbetegedésekben a laboratóriumi vizsgálatoknak jelentős szerepe van.

Az alábbi 3 területen a celluláris markervizsgálataim eredményeit összegzem.

### *Anémiák :*

- Megállapítottuk, hogy a vvt életkor és a vvt-k sejttérfogata közt normál minták esetén lineáris kapcsolat van míg anisocytosis esetén a vvt életkor paramétereit jelző markerek (glikált hemoglobin és retikulocytá) inverz kapcsolatba is kerülhetnek a sejttérfogattal.
- A paroxysmalis nocturnalis hemoglobinuria (PNH) esetén a a PNH klón nagysága leginkább a leukocyták és nem a vvt felszíni markerexpressziója alapján ítéltethető meg. Kimutattuk, hogy ezen belül is a legszenzitívebb marker a monocyták CD14 expressziójának vizsgálata. Bevezettünk egy új áramlási citometriai paramétert a PNH-s klón méretének megítélésére.

### *Akut leukémiák:*

- Kimutattuk, hogy a myeloid sejtek felszínén konstitutíven expresszáldó PSGL-1 nevű mucin a myeloblastos és monocytar/monoblastos akut myeloid leukémiák esetén differenciáltan expresszáldik.
- AML-ben a multidrog rezisztencia funkcionális tesztjét alkalmazva megállapítottuk annak diagnosztikai és prognosztikai értékét. Bevezettünk újfajta módszereket a funkcionális teszt és a felszíni markerexpresszió kombinálására.
- Igazoltuk, hogy a különböző intracelluláris markerek kimutatása esetén jelentősen eltérő szenzitivitás és specificitás jellemzi a permeabilizálási technikákat és a különböző intracelluláris markerek elleni antitest klónokat.

- A véralvadás XIII-as faktora intracelluláris formájának vizsgálata terén elsőként írtuk le annak megjelenését a humán ontogenezis és organogenezis során. Ezen kívül bevezettük az AML-ek áramlási citometria méréseken alapuló differenciáldiagnosztikájában ezen marker vizsgálatát. Akut lymphoblastos leukémiák jelentős részében - aberráns markerexpresszióként – számos módszerrel kimutattuk a FXIII-A intracelluláris megjelenését.

***Prothrombotikus állapotok:***

- Ischemiás stroke esetén kimutattuk a monocyták szöveti faktor expresszióját, miáltal hozzájárulhatnak a stroke-ban észlelhető alvadásaktivációhoz. Diabetes mellitusban több módszerrel igazoltuk a thrombocyták fokozott aktivációját és megállapítottuk ennek a klinikai képpel való kapcsolatát. Kimutattuk, hogy a postprandiális glükóz koncentráció korrelációt mutat az alvadásaktiváció jelző bizonyos laboratóriumi paraméterekkel.
- Ex vivo aktivált mintákon, megállapítottuk a különböző thrombocyta aktivációs markerek szenzitivitását illetve adatokat szolgáltatunk a PSGL-1 protektív szerepére állatkísérletes modellben, thrombocyta aktiváción keresztül kiváltott, in vivo thrombusképződés során.



## KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A tudományos munkát orvostanhallgatóként kezdtem el az 1980-as években. Ekkor 3 évig Muszbek László docens volt a témavezetőm, végzésem után pedig Ádány Róza adjunktusnő munkacsoportjába kerültem. A későbbi tudományos munkásságom mindkét személy alapvetően meghatározta. Köszönöm Muszbek professzor úr szakmai segítségét és támogatását, hogy az általa 1978-ban alapított intézet vezetését 2004-ben átvehettem.

Két alkalommal töltöttem összesen 3 évet az Egyesült Államokban. Robert Colman (Temple egyetem, Philadelphia) és Rodger McEver (OMRF, Oklahoma City) laboratóriumaiban világszínvonalú thrombosis kutatásba kapcsolódhattam be. Az európai sejtanalízis munkacsoport egyetlen magyar tagjaként több kollaborációt sikerült kiépítenem, elsősorban Alberto Orfao (Salamanca) és Jan Gratama (Rotterdam) munkacsoportjaival akiknek támogatásáért hálás vagyok.

Az eddig megjelent vagy elfogadott 73 közleményem alapjait képező vizsgálatok nagy részében klinikus és kutató társszerzők tucatjaival volt módom együtt dolgozni az évek során. Mindannyiuknak köszönöm segítő közreműködését, külön hálával tartozom első PhD hallgatómnak Dr. Karászi Évának. Az önálló munkacsoportként végzett laboratóriumi munkám első időszakában 2 asszisztensnő (később analitikus) segített a legtöbbet; Pálné Terdik Tünde és Györfiné Veszprémi Anikó. Az utóbbi években egyre inkább fiatal orvoskollégáim (Hevessy Zsuzsa, Kiss Flóra, Nagy Béla és Miszti-Blasius Kornél) eredményeire támaszkodhatok. Adminisztratív segítséget is többektől kaptam, de elsősorban Bhattoa-Buzás Edinának, Kópis Ildikónak és Antal Csabának tartozok köszönettel.

Hálás vagyok gyermekgyógyász édesapámnak, aki sajnos nagyon fiatalon elhunyt, hogy kisiskolás koromban a testnevelést és az angol nyelvet tartotta a legfontosabb

tantárgyaknak. Köszönöm édesanyámnak, hogy felnevelt és az orvosi pályára irányított. Feleségem, lányom és fiam harmonikus családi háttérrel biztosítanak és köszönöm, hogy két alkalommal is velem jöttek Amerikába, ezzel segítve munkámat.

Az értekezés gondos átolvasásáért Bhattoa Harjit Palnak, Miszti-Blasius Kornélnak Misz Máriának és Káldi Ildikónak tartozom köszönettel.

## AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK

### Könyvrészlet

**Kapelmayer J.** Áramlási citometria. in: Hematológiai betegségek atlasza szerk: Matolcsy András. Medicina Kiadó 2006; 19-24.

### Magyar nyelvű publikációk

1. Majoros J, **Kapelmayer J**, Kiss A, Kiss Cs., Kiss M, Jakó J és Muszbek L. Áramlási citometria alkalmazása kevert fenotípusú leukémiák diagnosztikájában. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina*. 1997;1:20-26.
2. Karászi É, Kiss Cs, Jakab Zs, Szegedi I, Hevessy Zs és **Kapelmayer J**. Gyermekkori akut leukémiák vizsgálata sejtfelszíni markerek és ploiditás alapján. *Gyermekgyógyászat* 1998;4: 319-329.
3. Kerényi A, Szegedi I, Sarudi S, **Kapelmayer J**, Kiss Cs és Muszbek L: A Glanzmann thrombasthenia II. típusa. Esetleírás *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina*. 1998;4: 162-168.
4. Nagy B jr, Veszprémi A, Kiss F, Miszti-Blasius K és **Kapelmayer J**. Thrombocyta aktivációs markerek összehasonlító elemzése áramlási citometriával in vitro aktivált mintákon. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina*. 2003;30: 46-54.
5. Hevessy Zs, Nagy B Jr, Kiss F, Kissné Sziráki V, Kiss A, Reményi Gy, **Kapelmayer J**. Paroxysmalis nocturnalis hemoglobinuria laboratóriumi diagnosztikája. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina*, 2004;31: 66-76.

## Nemzetközi publikációk

1. **Kappelmayer J**, Bacskó Gy, Birinyi L, Zákány R, Kelemen E and Ádány R. Consecutive appearance of factor XIII subunit A in macrophages, megakaryocytes and liver cells in early human development. *Blood* 1995;86: 2191-2197. IF: 8.569
2. **Kappelmayer J**, Misz M, Bereczki D, Oláh L, Fekete I, Csiba L and Blaskó G. Tissue factor is expressed on monocytes in young patients with stroke. *Cerebrovasc Dis.* 1998;8: 235-239. IF: 1.288
3. Kocsis A, Biró É, Rácz É, Kiss A and **Kappelmayer J**. Mean corpuscular volume is not a reliable marker of red cell age in case of anisocytosis. *Ann Haematol.* 1998;77:149-152. F: 1.397
4. **Kappelmayer J**, Gratama J, Karászi É, Menéndez P, Ciudad J, Rivas R and Orfao A. Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a. Interaction between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols. *J Immunol Methods.* 2000;242: 53-65. IF: 1.995
5. Karászi É, Jakab K, Homolya L, Szakács G, Holló Zs, Telek B, Kiss A, Rejtő, L, Nahajevszky S, Sarkadi B and **Kappelmayer J**. Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Brit J Haematol.* 2001;112: 308-314. IF: 2.815

6. **Kappelmayer J**, Kiss A, Karászi É, Veszprémi A, Jakó J and Kiss C. Identification of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 as a useful marker in acute myeloid leukaemias. *Brit J Haematol.* 2001;115:903-909. IF: 2.815
7. Káplár M, **Kappelmayer J**, Veszprémi A, Szabó K and Udvardy M. The role of in vivo formation of platelet-leukocyte aggregates in the pathogenesis of diabetic angiopathy. *Platelets* 2001;12: 419-422. IF: 0.778
8. **Kappelmayer J**, Karászi É, Telek B and Jakab K. “Pros and cons” on how to measure drug resistance in leukemias. *Leukemia Lymphoma.* 2002;43: 711-717. IF: 1.335
9. Magyar MT, Szikszai Z, Balla J, Valikovics A, **Kappelmayer J**, Imre S, Balla G, Jeney V, Csiba L and Bereczki D. Early onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. *Stroke* 2003;34: 58-63. IF: 5.233
10. Nagy H, Goda K, Fenyvesi F, Bacsó Z, Szilasi M, **Kappelmayer J**, Lustyik G, Cianfriglia M and Szabó G Jr. Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein specific antibodies. *Biochem Bioph Res Co.* 2004;315: 942-949. IF: 2.904

11. Jakó J, Szerafin L, Nagy P, Simon Á and **Kappelmayer J**. Familial malignant blood diseases. Lessons learned from a 20 year period. *Leukemia Lymphoma*. 2004;45: 109-111.

IF: 1.147

12. **Kappelmayer J**, Nagy B, Miszti-Blasius K, Hevessy Z and Setiadi H. The emerging value of P-selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42: 475-486.

IF: 1.685

13. Losonczy G, Rosenberg N, Kiss Cs, **Kappelmayer J**, Vereb G, Kerényi A, Balogh I and Muszbek L. A novel homozygous mutation (1619delC) in GPIIb gene associated with Glanzmann thrombasthenia, the decay of GPIIb-mRNA and the synthesis of a truncated GPIIb unable to form complex with GPIIIa. *Thromb Haemost*. 2005;93: 904-909.

IF: 3.056

14. **Kappelmayer J**, Simon Á, Katona É, Szanto A, Nagy L, Kiss A, Kiss Cs and Muszbek L. Coagulation factor XIII-A: a flow cytometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias. *Thromb Haemost*. 2005;94: 454-459.

IF: 3.056

15. Katona É, Nagy B, **Kappelmayer J**, Baktai Gy, Kovács L, Márialigeti T and Muszbek L. Factor XIII in bronchoalveolar lavage fluid from children with chronic bronchoalveolar inflammation. *J Thromb Haemost*. 2005;7: 1407-1413.

IF: 5.262

16. Hevessy Z, Nagy B Jr, Kiss F, Kiss A and **Kappelmayer J**. Mean fluorescence intensity rate is a useful marker in the detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43: 919-923.

IF: 1.918

17. Ratei R, Wolf-Dieter L, Lacombe F, del Poeta G, Kraan, J, Gratama J, **Kappelmayer J** Karawajew L, Jagoda K, Bjorklund L, de Santiago M and Orfao A. Normal lymphocytes from leukemic samples as an internal quality control for fluorescence intensity in immunophenotyping of acute leukemias" *Cytom Part B-Clin Cy*. 2006;70: 1-9.

IF: 1.742

18. Szük T, Nagy B Jr, Bereczky Z, Kőszegi Z, Édes I and **Kappelmayer J**. Effects of "ad hoc" clopidogrel loading versus pre-treatment on P-selectin expression after coronary stent implantation. *Platelets* 2006;17:344-346.

IF: 1.451

19. Kiss F, Hevessy Z, Veszprémi A, Katona É, Vereb G, Kiss C, Muszbek L and **Kappelmayer J**. Leukemic lymphoblasts: a novel expression site for coagulation factor XIII subunit A. *Thromb Haemost*. 2006;96: 176-182.

IF: 3.056

## IRODALOMJEGYZÉK

- Adany R, Bardos H, Antal M, Modis L, Sarvary A, Szucs S and Balogh I. Factor XIII of blood coagulation as a nuclear crosslinking enzyme. *Thromb Haemost.* 2001;85:845-851.
- Adany R, Belkin A, Vasilevskaya T and Muszbek L. Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol.* 1985;38:171-173.
- Adany R, Glukhova MA, Kabakov AY and Muszbek L. Characterisation of connective tissue cells containing factor XIII subunit a. *J Clin Pathol.* 1988;41:49-56.
- Adany R, Kappelmayer J, Berenyi E, Szegedi A, Fabian E and Muszbek L. Factors of the extrinsic pathway of blood coagulation in tumour associated macrophages. *Thromb Haemost.* 1989;62:850-855.
- Adany R, Kiss A and Muszbek L. Factor XIII: a marker of mono- and megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol.* 1987;67:167-172.
- Alfinito F, Del Vecchio L, Rocco S, Boccuni P, Musto P and Rotoli B. Blood cell flow cytometry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a tool for measuring the extent of the PNH clone. *Leukemia.* 1996;10:1326-1330.
- Amirkhosravi A, Alexander M, May K, Francis DA, Warnes G, Biggerstaff J and Francis JL. The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay. *Thromb Haemost.* 1996;75:87-95.



- Andre P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol.* 2004;126:298-306.
- Andrews RK and Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res.* 2004;114:447-453.
- Bath PM and Butterworth RJ. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996;7:157-161.
- Berkow RL and Dodson RW. Volume dependent polymorphonuclear leukocytes fractions isolated by counterflow centrifugal elutriation: PMN volume does not correlate with PMN age. *J Leukoc Biol.* 1987;41:518-526.
- Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G and Sampol J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry.* 1996;26:137-147.
- Bosch FH, Werre JM, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Huls TH, Willekens FL and Halie MR. Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counterflow centrifugation and Percoll separation. *Blood.* 1992;79:254-260.
- Buccheri V, Matutes E, Dyer MJ and Catovsky D. Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia. *Leukemia.* 1993;7:919-927.
- Caligaris-Cappio F. How immunology is reshaping clinical disciplines: the example of haematology. *Lancet.* 2001;358:49-55.

Ceriello A. The post-prandial state and cardiovascular disease: relevance to diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000;16:125-132.

Cerletti C, Evangelista V and de Gaetano G. P-selectin-beta 2-integrin cross-talk: a molecular mechanism for polymorphonuclear leukocyte recruitment at the site of vascular damage. *Thromb Haemost*. 1999;82:787-793.

Cermak J, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS and Vercellotti GM. C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood*. 1993;82:513-520.

Chan JK, Ng CS and Hui PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology*. 1988;12:461-480.

Chorvath B and Sedlak J. Hematopoietic cell differentiation antigens (CD system 1997). Cancer research relevance. *Neoplasma*. 1998;45:273-276.

Clemetson KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M and Luscher EF. Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest*. 1982;70:304-311.

Cohen NS, Ekholm JE, Luthra MG and Hanahan DJ. Biochemical characterization of density-separated human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1976;419:229-242.

- Conkling PR, Greenberg CS and Weinberg JB. Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes. *Blood*. 1988;72:128-133.
- D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Dell'Olio M, Di Renzo N and Carotenuto M. Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Hematol*. 2000;64:275-281.
- d'Onofrio G, Chirillo R, Zini G, Caenaro G, Tommasi M and Micciulli G. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. *Blood*. 1995;85:818-823.
- Dardik R, Loscalzo J, Eskaraev R and Inbal A. Molecular mechanisms underlying the proangiogenic effect of factor XIII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:526-532.
- Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A and Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004;34:392-401.
- Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Muhlegger N, Fritsch G and Gadner H. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99:1952-1958.
- Eldor A, Avitzour M, Or R, Hanna R and Penchas S. Prediction of haemorrhagic diathesis in thrombocytopenia by mean platelet volume. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;285:397-400.

- Garg SK and Niemetz J. Tissue factor activity of normal and leukemic cells. *Blood*. 1973;42:729-735.
- Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rudiger S and Schomig A. Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart*. 1996;76:166-172.
- Ghetie MA, Ghetie V and Vitetta ES. Anti-CD19 antibodies inhibit the function of the P-gp pump in multidrug-resistant B lymphoma cells. *Clin Cancer Res*. 1999;5:3920-3927.
- Griesinger F, Piro-Noack M, Kaib N, Falk M, Renziehausen A, Troff C, Grove D, Schnittger S, Buchner T, Ritter J, Hiddemann W and Wormann B. Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *Br J Haematol*. 1999;105:241-255.
- Gurney D, Lip GY and Blann AD. A reliable plasma marker of platelet activation: does it exist? *Am J Hematol*. 2002;70:139-144.
- Hall SE and Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996;87:5332-5340.
- Hollo Z, Homolya L, Davis CW and Sarkadi B. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1191:384-388.

- Hollo Z, Homolya L, Hegedus T, Muller M, Szakacs G, Jakab K, Antal F and Sarkadi B. Parallel functional and immunological detection of human multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1. *Anticancer Res.* 1998;18:2981-2987.
- Homolya L, Hollo M, Muller M, Mechetner EB and Sarkadi B. A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer.* 1996;73:849-855.
- Horwitz M, Sabath DE, Smithson WA and Radich J. A family inheriting different subtypes of acute myelogenous leukemia. *Am J Hematol.* 1996;52:295-304.
- Jacobberger JW. Flow cytometric analysis of intracellular epitopes. In: NJ Stewart CC, ed. Immunophenotyping: Wiley-Liss; 2000.
- Jarolim P, Rubin HL, Brabec V, Chrobak L, Zolotarev AS, Alper SL, Brugnara C, Wichterle H and Palek J. Mutations of conserved arginines in the membrane domain of erythroid band 3 lead to a decrease in membrane-associated band 3 and to the phenotype of hereditary spherocytosis. *Blood.* 1995;85:634-640.
- Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS and Hebbel RP. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1842-1843.
- Kappelmayer J and Adany R. Factors of the extrinsic pathway of blood coagulation in fetal placental macrophages. *Am J Reprod Immunol.* 1989;21:37-40.

- Kappelmayer J, Bacsko G, Kelemen E and Adany R. Onset and distribution of factor XIII-containing cells in the mesenchyme of chorionic villi during early phase of human placentation. *Placenta*. 1994;15:613-623.
- Kappelmayer J, Berecki D, Mész M, Olah L, Fekete I, Csiba L and Blaskó G. Monocytes express tissue factor in young patients with cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis*. 1998;8:235-239.
- Katona EE, Ajzner E, Tóth K, Karpati L and Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods*. 2001;258:127-135.
- Kipps TJ. The cluster of differentiation antigens. In: L Beutler, Coller, Kipps, Seligson., ed. Hematology: McGraw-Hill; 2001:141-145.
- Klein I, Sarkadi B and Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1461:237-262.
- Kocsis A, Biro E, Rácz E, Kiss A and Kappelmayer J. Mean corpuscular volume is not a reliable marker of red cell age in case of anisocytosis. *Ann Hematol*. 1998;77:149-151.
- Krauss JS. Laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Clin Lab Sci*. 2003;33:401-406.

- Lan HY, Hutchinson P, Tesch GH, Mu W and Atkins RC. A novel method of microwave treatment for detection of cytoplasmic and nuclear antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1996;190:1-10.
- Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP and Moore KL. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood*. 1996;88:3010-3021.
- Legrand O, Zittoun R and Marie JP. Role of MRP1 in multidrug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1999;13:578-584.
- Levy GA, Schwartz BS, Curtiss LK and Edgington TS. Plasma lipoprotein induction and suppression of the generation of cellular procoagulant activity in vitro. *J Clin Invest*. 1981;67:1614-1622.
- Lowe GD, Machado SG, Krol WF, Barton BA and Forbes CD. White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 1985;54:700-703.
- Maciejewski JP, Young NS, Yu M, Anderson SM and Sloand EM. Analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins on platelets from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Thromb Res*. 1996;83:433-447.
- Maecker HT, Todd SC and Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *Faseb J*. 1997;11:428-442.

- Maia RC, Wagner K, Cabral RH and Rumjanek VM. Heparin reverses Rhodamine 123 extrusion by multidrug resistant cells. *Cancer Lett.* 1996;106:101-108.
- Maillet P, Alloisio N, Morle L and Delaunay J. Spectrin mutations in hereditary elliptocytosis and hereditary spherocytosis. *Hum Mutat.* 1996;8:97-107.
- McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost.* 2001;86:746-756.
- McEver RP. P-selectin and PSGL-1: exploiting connections between inflammation and venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2002;87:364-365.
- McEver RP. Interactions of selectins with PSGL-1 and other ligands. Ernst Schering Res Found Workshop. Vol. 44; 2004:137-147.
- Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR and Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104:1533-1537.
- Millard I, Degraeve E, Philippe M and Gala JL. Detection of intracellular antigens by flow cytometry: comparison of two chemical methods and microwave heating. *Clin Chem.* 1998;44:2320-2330.



- Misz M, Olah L, Kappelmayer J, Blasko G, Udvardy M, Fekete I, Csepany T, Ajzner E, Csiba L. Hemostatic abnormalities in ischemic stroke. *Orv Hetil.* 1998;139:2503-2507.
- Muhlfelder TW, Niemetz J, Kreutzer D, Beebe D, Ward PA and Rosenfeld SI. C5 chemotactic fragment induces leukocyte production of tissue factor activity: a link between complement and coagulation. *J Clin Invest.* 1979;63:147-150.
- Muszbek L, Adany R, Kawai M, Boda Z and Lopaciuk S. Monocytes of patients congenitally deficient in plasma factor XIII lack factor XIII subunit a antigen and transglutaminase activity. *Thromb Haemost.* 1988;59:231-235.
- Muszbek L, Adany R, Szegedi G, Polgar J and Kawai M. Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res.* 1985;37:401-410.
- Muszbek L, Polgar J, Kappelmayer J, Karges H, Adany, R. Activation of cellular FXIII. In: J McDonagh, Seitz, R., Egbring, R. ed. Proceedings of the second international conference on factor XIII.: Schattauer; 1993:58-60.
- Myers J. Antigen retrieval: a review of commonly used methods and devices. *MLO Med Lab Obs.* 2006;38:10, 12-15; quiz 16-17.
- Nemes Z, Thomazy V, Adany R and Muszbek L. Identification of histiocytic reticulum cells by the immunohistochemical demonstration of factor XIII (F-XIIIa) in human lymph nodes. *J Pathol.* 1986;149:121-132.

Niemetz J. Coagulant activity of leukocytes. Tissue factor activity. *J Clin Invest.* 1972;51:307-313.

Nurden AT. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1773-1782.

Olah L, Misz M, Kappelmayer J, Ajzner E, Csepany T, Fekete I, Bereczki D, Blasko G, Csiba L. Natural coagulation inhibitor proteins in young patients with cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis.* 2001;12:291-7.

Piedras J and Lopez-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. *Cytometry.* 2000;42:234-238.

Pitlik E and Holló Z. A multidrog rezisztencia jelentősége a rosszindulatú daganatok terápiájában. *Orvosi Hetilap.* 1996;1461:237-262.

Porwit-MacDonald A, Janossy G, Ivory K, Swirsky D, Peters R, Wheatley K, Walker H, Turker A, Goldstone AH and Burnett A. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21). *Blood.* 1996;87:1162-1169.

Prentice RL, Szatrowski TP, Fujikura T, Kato H, Mason MW and Hamilton HH. Leukocyte counts and coronary heart disease in a Japanese cohort. *Am J Epidemiol.* 1982;116:496-509.

- Qadir M, Barcos M, Stewart CC, Sait SN, Ford LA and Baer MR. Routine immunophenotyping in acute leukemia: Role in lineage assignment and reassignment. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006.
- Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA and Smith BR. Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood.* 1991;78:1730-1737.
- Rivers RP, Hathaway WE and Weston WL. The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br J Haematol.* 1975;30:311-316.
- Rothe G and Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
- Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, Moro MJ, Corrales A, Calmuntia MJ, San Miguel JF and Orfao A. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia.* 2002;16:1460-1469.
- Sarvary A, Szucs S, Balogh I, Becsky A, Bardos H, Kawai M, Seligsohn U, Egbring R, Lopaciuk S, Muszbek L and Adany R. Possible role of factor XIII subunit A in Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *Cell Immunol.* 2004;228:81-90.

- Schlant RC, Forman S, Stamler J and Canner PL. The natural history of coronary heart disease: prognostic factors after recovery from myocardial infarction in 2789 men. The 5-year findings of the coronary drug project. *Circulation*. 1982;66:401-414.
- Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT and Shankey TV. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost*. 1998;79:885-896.
- Schubert J, Alvarado M, Uciechowski P, Zielinska-Skowronek M, Freund M, Vogt H and Schmidt RE. Diagnosis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br J Haematol*. 1991;79:487-492.
- Schwartz BS and Edgington TS. Immune complex-induced human monocyte procoagulant activity. I. a rapid unidirectional lymphocyte-instructed pathway. *J Exp Med*. 1981;154:892-906.
- Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M and Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*. 1985;260:11107-11114.
- Singer SJ and Nicolson GL. The structure and chemistry of mammalian cell membranes. *Am J Pathol*. 1971;65:427-437.
- Singer SJ and Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972;175:720-731.

- Smyth SS, Reis ED, Vaananen H, Zhang W and Collier BS. Variable protection of beta 3-integrin--deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. *Blood*. 2001;98:1055-1062.
- Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies. *J Intern Med*. 2000;247:521-534.
- Sréter L, Kovács G and Matolcsy A. Anémiák. In: A Matolcsy, M Udvardy & L Kopper, eds. Hematológiai betegségek atlasza: Medicina; 2006:69-87.
- Thomas H and Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*. 2003;10:159-165.
- Torocsik D, Bardos H, Nagy L and Adany R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2132-2139.
- Tracey JB and Rinder HM. Characterization of the P-selectin ligand on human hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 1996;24:1494-1500.
- Ushiyama S, Laue TM, Moore KL, Erickson HP and McEver RP. Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J Biol Chem*. 1993;268:15229-15237.
- Vachino G, Chang XJ, Veldman GM, Kumar R, Sako D, Fouser LA, Berndt MC and Cumming DA. P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. *J Biol Chem*. 1995;270:21966-21974.

- van der Vegt SG, Ruben AM, Werre JM, Palsma DM, Verhoef CW, de Gier J and Staal GE. Counterflow centrifugation of red cell populations: a cell age related separation technique. *Br J Haematol*. 1985;61:393-403.
- Vaysse J, Vassy R, Eclache V, Gattegno L, Bladier D and Pilardeau P. Some characteristics of human red blood cells separated according to their size: a comparison with density-fractionated red blood cells. *Am J Hematol*. 1988;28:232-238.
- Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA and Damjanovich S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8053-8058.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184:39-51.
- Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T and Kern W. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;62:25-38.
- Yeh ET, Kamitani T and Chang HM. Biosynthesis and processing of the glycosylphosphatidylinositol anchor in mammalian cells. *Semin Immunol*. 1994;6:73-80.